

平成21年4月7日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591296
研究課題名（和文） 新規カルシウム反応性転写因子が表皮角化細胞の分化・増殖に果たす役割の解明
研究課題名（英文） The role of the novel calcium-responsive transcription factors in keratinocyte proliferation and differentiation
研究代表者
川内 康弘（KAWACHI YASUHIRO）
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：00272196

研究成果の概要：

Yin Yang-1(以下 YY-1)は偏在する転写因子であり、様々な転写制御に関わっていると言われています。YY-1 蛋白は多くの組織や細胞で同定されており、またその働きは組織や細胞で異なります。我々は以前 YY-1 蛋白が表皮基底層で強く発現され、上層に行くにつれて弱くなることを確認しました。この結果を元に、YY-1 が表皮角化細胞の分化過程により重要な役割を担っているのではないかと考え、新たに 3D 培養法という手法と、角化細胞のセルラインである HaCaT 細胞を用い、研究を行いました。結果として、過発現した YY-1 は 3D 培養において、表皮の著明な肥厚、分化の抑制、未分化状態の維持、及び分裂能の増加などを示しました。これらは、通常の皮膚組織において、YY-1 が表皮基底層における角化細胞の未分化状態の維持と、上層での分化移行に重要な働きを示唆しています。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：表皮、角化、転写因子

1. 研究開始当初の背景

表皮は自己分裂を繰り返し、細胞の発達お

よび分化過程を研究するために魅力的な臓器です。表皮ケラチノサイトは、最下層に存

在し1層からなる基底層で、周期的な細胞分裂の結果、誕生します。その後、娘細胞を表皮上層へ移行させます。上層へ移行・移動した表皮ケラチノサイトは、細胞外からの様々なシグナルや、非常に綿密に制御された遺伝子転写調節による分化過程を経て、多角形から徐々に扁平な形状へと変化していきます。その結果、表皮に層状構造を構築し、最終的には脱核した死細胞である角層細胞が重なり合い、強固なバリアーである角層を形成し、外部から体を守る働きをします。

過去の研究の結果、この分化過程において、表皮ケラチノサイトはそれぞれの分化段階に特異的な分化遺伝子マーカーを発現することが知られています。

基底層の未分化角化細胞はケラチン 5(K5)と14(K14)を発現し、分化が始まる有棘層ではK5,14の発現が弱くなる代わりに、ケラチン1(K1)とケラチン10(K10)が誘導されるようになります。更に分化が進んだ顆粒層付近では、K1,10の発現が弱くなり、角化に強く関与すると言われるフィラグリン、インボルクリン、ロリクリン (filaggrin、involcrin、loricrin) などの転写が始まります。

2. 研究の目的

in vitro で皮膚の三次元 (3D) 培養法は、表皮ケラチノサイトの生物学と病理学研究のために長い間使用され、かつ臨床的に適用されてきました。収縮させた真皮線維芽細胞を含んでいるコラーゲンゲル上で、かつ表層のみ空気に接し、下部より液体培地で培養される条件に置くことで、これらの細胞は層状構造を形成して、最終的に分化を認めることが示されました。今回の研究において、我々は表皮ケラチノサイトの分化制御において Yin Yang-1 (以下 YY1) の役割を解明するために、この 3D 培養システムを使用しました。

我々は、*in vivo* と *in vitro* で YY-1 タンパク質が基底層の未分化ケラチノサイトで特に高水準で発現し、上層へ向かう分化の過程で、著しく減弱することを確認し、YY-1 が *loricrin* 遺伝子に結合し、機能的にその転写活性を抑制することを以前報告しました。このことより、YY-1 は未分化表皮ケラチノサイトの遺伝子発現管理だけでなく、細胞の分化過程をも管理もするかもしれないと考え、現在の研究において、表皮ケラチノサイトのセルラインである HaCaT 細胞を用いて、YY-1 の役割を調べました。

3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞を、タイプ I コラーゲンジェル (Cellmatrix IA、新田ゼラチン) に混入し、6well プレート (3mL/well) に注ぎ、37°C で 30 分インキュベートします。その後、HaCaT 細胞をゲル上に均一に撒き、一晩おきます。使用する培地は、MCBD153 と DMEM を 1:1 で混合した上で、抗生剤や 10%FBS、10ng/mL EGF など混合し作製しました。翌日、培養ゲルを滅菌された注射針でプレートから分離され、ゲルが適当な大きさに収縮するまで、2 日に 1 回の培地交換は約 1 週間続けられました。その後、セルストレイナーを逆にセットし、収縮したゲルをメッシュに置きました。培地はゲルの下端に触れる程度で、表面は空気に触れる状態としました。我々は、3D 培養に使用した HaCaT 細胞に YY-1 を形質導入し、YY-1 蛋白が過発現したものを使用しました。行った実験は、結果で得られた表皮肥厚の程度を実測で評価し、ウエスタンブロッティング法や免疫組織染色を用い、分化マーカーの発現状況を調べたりしました。また、細胞分裂能の変化を評価するために、様々な手法を用い評価しました。

4. 研究成果

(1) 図 1 に示したように、左列のコントロールは時間経過とともに、層状構造を構築し、表皮構造に擬態している状態を示しました。4-7 日では 3 層程度であったものの、徐々に肥厚し 14 日目では 7-8 層となりました。分化過程を経るにつれ、基底細胞層は立方的な形態を示し、表層の細胞はより扁平な形状となり、角化を連想させました。他方、YY-1 を過発現している HaCaT 細胞の 3D 培養組織は、著しく増殖し、表皮肥厚を示しました(図 1 右列)。実測では、コントロールと比較して約 3 倍以上の表皮肥厚を示しました。

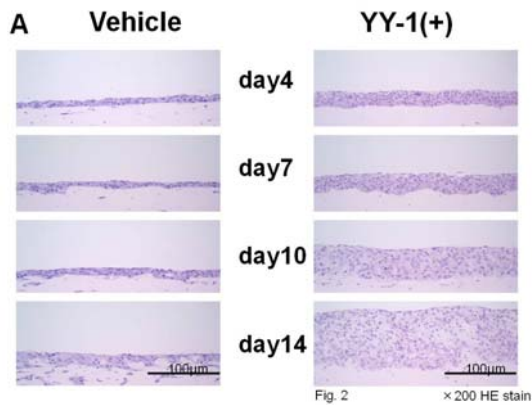


図 1: コントロールと YY-1 過発現 HaCaT 細胞の 3D 培養組織による比較

(2) 表皮ケラチノサイトの分化における YY-1 の影響を評価するために、免疫ブロット法を利用して、分化マーカーの評価を行いました。未分化な表皮ケラチノサイトで発現するマーカーである K14、分化の初期段階で発現する K1、そして分化の後期で発現するインボルクリンを抗体として使用しました。図 2 で示すように、分化段階で発現するマーカー遺伝子である K1 とインボルクリンは、コントロールと比較して YY-1 が過発現している HaCaT 細胞で著しく減少しました。

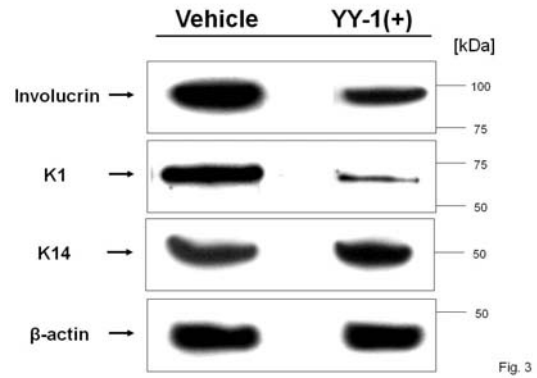


図 2: YY-1 過発現が HaCaT 細胞の分化マーカー遺伝子に与えるの影響

(3) 次に、各層での表皮ケラチノサイトの分化状況を評価するために、免疫組織染色を利用して、分化マーカーの評価を行いました。使用した分化マーカーは図 2 のインボルクリンと K14 に加え、分化の初期段階で発現する K10、そして分化の後期で発現するフィラグリンを抗体として使用しました。K14 は両者とも染色されていますが、YY-1(+) がほぼ全層であるのに対し、コントロールでは基底層付近で強く染まっています。コントロールでは K10、フィラグリン、インボルクリンとそれぞれ本来発現する層で染まっている(図 3 左列)のに対し、YY-1(+) では全く染色されませんでした(図 3 右列)。

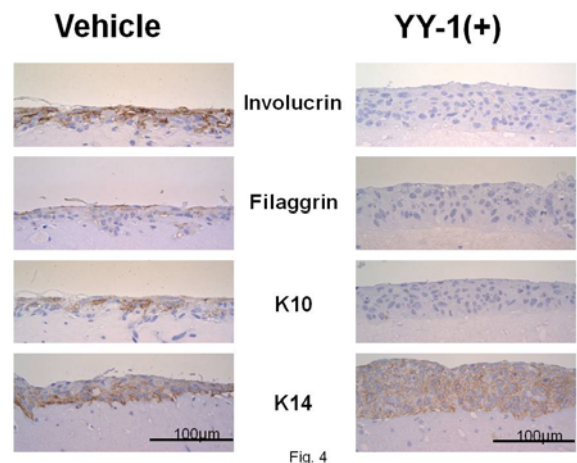


図 3: 3D 培養を用いた YY-1 が各層の分化に与える影響を免疫組織染色にて評価

(4)表皮の著明な肥厚は、細胞増殖能の増加を示唆しました。YY-1による細胞増殖への影響を調べるために、単層の HaCaT 細胞による BrdU 取り込み分析を行いました(図 4)。YY-1 過発現させた HaCaT 細胞は、コントロールと比較して、10 倍以上高い BrdU 取り込みを示しました。また、4 日目の 3D 培養組織を細胞増殖のマーカーである Ki-67 で染色し、コントロールは基底層付近で染色するのに対し、YY-1 では全層で細胞増殖が亢進しているのが分かりました。これらの結果は、YY1 が分化過程の初期に表皮ケラチノサイト増殖を促進していることを示します。

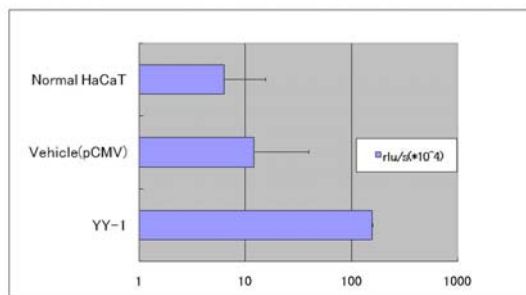


Fig. 5A

図 4: BrdU 試験による YY-1 が HaCaT 細胞の増殖能に与える影響の評価

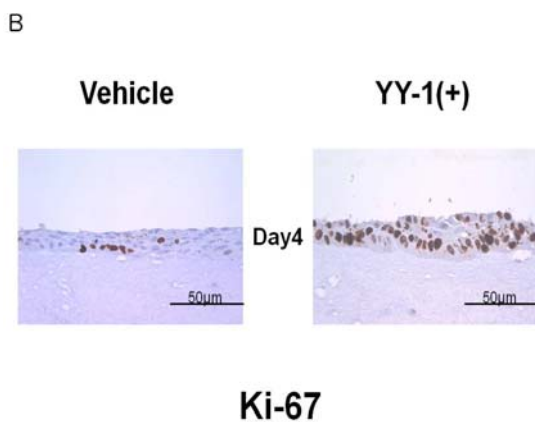


Fig. 5B

図 5: 細胞増殖マーカー Ki-67 による組織染色

(5) 細胞増殖や細胞周期に関与するセルシグナル関係のタンパク質発現量をウェスタンブロットングにて評価しました。図 6 に示すように、コントロールと比較すると、YY-1 過発現している HaCaT 細胞は細胞周期の進行を阻害し、増殖抑制に働くといわれる p21,16 は低下し、細胞分裂の G2/M 期の促進因子であるサイクリン B1 は増加しています。以上より、YY1 により細胞分裂と増殖が起りやすい状態にあることが分かりました。

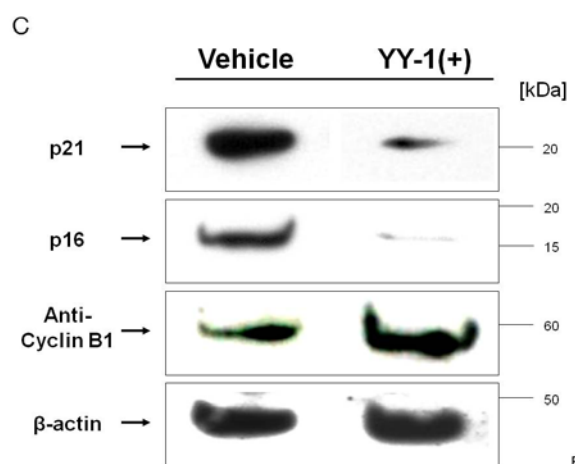


Fig. 5

図 6: 細胞周期・分裂能に対する YY-1 の影響の評価

我々は、3D 培養という手法によって、YY-1 が HaCaT 細胞の著明な肥厚を呈することを示し、表皮ケラチノサイトを未分化な状態、そして細胞増殖的な状態の維持を保つ重要な役割があることを証明しました。

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 16 件)

1. Fujisawa Y, Ito S, Mori K, Kawachi Y, Otsuka F. Combined therapy of selective embolization followed by surgery in a case

- of giant arteriovenous malformation in the buttock. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. In press (査読有)
2. **Kawachi Y**, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superimposed segmental dermatitis in a patient with chronic prurigo. *Eur J Dermatol*. in press (査読有)
 3. Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Nakamura Y, Takahashi T, **Kawachi Y**, Otsuka F, Onodera M. The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. *Exp Dermatol*. 18: 396-403, 2009 (査読有)
 4. **Kawachi Y**, Nakamura Y, Yoh K, Suzuki T, Furuta J, Fujisawa Y, Takahashi T, Otsuka F: Rheumatoid papules successfully treated with oral tacrolimus. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*. 2008; 22: 241-242 (査読有)
 5. **Kawachi Y**, Xu X, Tguchi S, Sakurai H, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Furuta J, Takahashi T, Itoh K, Yamamoto M, Yamazaki F, Otsuka F: Attenuation of UVB-Induced Sunburn Reaction and Oxidative DNA Damage with No Alterations in UVB-induced Skin Carcinogenesis in *Nrf2* Gene-Deficient Mice. *J Invest Dermatol*, 2008; 128: 1773-1779 (査読有)
 6. **Kawachi Y**, Koike Y, Kano T, Furuta J, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, Otsuka F: Paraneoplastic dermatomyositis triggered and exacerbated by oral 5-fluorouracil administration. *Eur J Dermatol*, 2008; 18: 195-196 (査読有)
 7. Fujisawa Y, Takahashi T, Enomoto H, Nakamura Y, **Kawachi Y**, Otsuka F. A case of proximal-type epithelioid sarcoma which showed positive reactivity to fibroblast growth factor receptor2-IIIb isotype. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22: 1372-1373 (査読有)
 8. **Kawachi Y**, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, Otsuka F. Epidermal pseudocarcinomatous hyperplasia with underlying epidermal growth factor-producing cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorder. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 23: 181-183 (査読有)
 9. Fujisawa Y, Nakamura Y, Takahashi T, **Kawachi Y**, Otsuka F. Penile preservation surgery in a case of extramammary Paget's disease involving the glans penis and distal urethra. *Dermatol Surg*. 2008; 34: 823-830 (査読有)
 10. Nakamura Y, **Kawachi Y**, Furuta J, Otsuka F. Severe local skin reactions to interferon beta-1b in multiple sclerosis - improvement by deep subcutaneous injection. *Eur J Dermatol*. 2008; 18: 579-582 (査読有)
 11. Yasuhiro Nakamura, Xuezhong Xu, Yoshio Saito, Takeshi Tateishi, Takenori Takahashi, **Yasuhiro Kawachi**, Fujio Otsuka: Deep cutaneous infection by *Fusarium solani* in a healthy child: successful treatment with local heat therapy. *Journal of American Academy of Dermatology*. 2007; 56: 873-877 (査読有)
 12. Kazusa Ishizaki, Akiko Yamada, Keigyou Yoh, Takako Nakano, Homare Shimohata, Atsuko Maeda, Yuki Fujioka, Naoki Morito, **Yasuhiro Kawachi**, Kazuko Shibuya, Fujio Otsuka, Akira Shibuya, Satoru Takahashi: Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate the responses in t-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *Journal of Immunology*; 2007; 178: 605-612 (査読有)
 13. Hiroshi Maruyama, **Yasuhiro Kawachi**, Yasuhiro Fujisawa, Syusaku Itoh, Junichi Furuta, Yoshiyuki Ishii, Takenori Takahashi, Takashi Hashimoto, Fujio Otsuka: IgA/IgG pemphigus positive for anti-desmoglein 1 autoantibody. *European Journal of Dermatology*; 2007; 17: 94-95 (査読有)
 14. **Kawachi Y**, Maruyama H, Furuta J, Fujisawa Y, Nakamura Y, Takahashi T, Otsuka F: Cutaneous deep necrosis with dermatomyositis: correlation with interstitial pneumonia. *European Journal of Dermatology*. 2007; 17: 345-346 (査読有)
 15. Nakamura Y, **Kawachi Y**, Xu X, Sakurai H, Ishii Y, Takahashi T, Otsuka F: The combination of ubiquitous transcription factors AP-1 and Sp1 directs keratinocyte-specific and differentiation-specific gene expression in vitro. *Experimental Dermatology*. 2007; 16: 143-150 (査読有)

16. **Kawachi Y**, Itoh M, Fujisawa Y, Banno T, Takahashi T, Otsuka F: Epidermal cell necrosis with direct epidermal infiltration of EB-ER-positive T lymphocytes in a patient with Epstein-Barr-virus-associated hemophagocytic syndrome. *British Journal of Dermatology*. 2007; 157: 1053-1056 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川内 康弘 (KAWACHI YASUHIRO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授
研究者番号 : 00272196

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし