

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790243
 研究課題名（和文）p63 新規標的分子による皮膚の発生・再生の分子機構とその治療への応用
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms of skin development and regeneration through p63 target molecules
 研究代表者
 市川 智恵 (CHIKAWA TOMOE)
 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員
 研究者番号：60383288

研究成果の概要：皮膚形成に必須な転写因子 p63 の標的分子を探索し、growth differentiation factor 15(GDF15) を同定した。GDF15 はケラチノサイトの分化過程において極めて重要な役割を担うことを示した。また、p63 の下流分子として細胞外マトリクス蛋白質 matrilin-2 を同定した。matrilin-2 は細胞遊走に關与す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
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：発生・分化、生理活性、発現制御、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

再生医療が注目されるようになり、多様な研究分野で組織や臓器の再生に関心が高まっている。皮膚においては、同種皮膚移植や培養表皮の臨床応用が進められている。移植後の皮膚は永久的には生着せずに脱落するが、培養表皮は数週間かけて次第に置換されていくと考えられていることから、その間に培養表皮から放出される様々な生理活性物質が患部皮膚の再生・治癒を促進する重要な役割を担うと考えられる。しかしながら、そのプロセスに關与する分子や作用メカニズムには明らかでない点が多く、これからの培養表皮の普及へ向けて、培養表皮を構成するケラチノサイト（角化細胞）の産生する生理

活性物質とその発現調節機構の解明が注目されている。

一方で、皮膚の形成には、転写因子 p63 が必須な因子であることが知られている。p63 は近年同定された分子で、p73 とともに、がん抑制遺伝子である p53 ファミリーに属し、これまでに報告されている p53 標的分子の転写制御にも關与することが報告されている。p53 欠損マウスではマウスの発生に影響が認められないのに対し、p63 欠損マウスでは、四肢の形成異常と重層化上皮欠損が顕著に認められ、このマウスは、層状の表皮形成ができないために、生後まもなく脱水により死亡する。このマウスの特徴からも、p63 が表皮形成に重要な役割を担うことが明らか

であり、そのメカニズムの解明が注目されていた。

2. 研究の目的

上記の臨床および学術的背景から、p63 が表皮再生のキーレギュレーターである可能性が推測される。これまでの報告で、p63 は表皮幹細胞が存在する基底細胞層に強く発現しており、分化の進んだ重層化上皮では発現が低下している結果が得られていることから、p63 が幹細胞を含めた基底細胞の生理活性を調節していると考えられる。そこで、皮膚の発生および創傷治癒過程において p63 の下流分子が、ケラチノサイトの増殖・分化に必要な細胞外マトリクス環境の構築に関与するのではないかと考えた。p63 は、transactivation domain (TA) を有する TAp63 と、TA を持たない Δ Np63 の 2 つのアイソフォームに大別される。TAp63 と Δ Np63 はマウス胎児の皮膚において発現時期が異なることから、上流および下流の制御分子の違いや、その役割の違いも指摘されているが、その解析は進んでいない。本研究では、TAp63 と Δ Np63 の両者を区別して、ケラチノサイトにおける各 p63 アイソフォームの標的分子の同定を試み、特に、分泌性の生理活性物質を探索・同定し、表皮分化・再生における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトケラチノサイト細胞株である HaCaT 細胞に TAp63 あるいは Δ Np63 を過剰発現およびノックダウンして、PCR アレイ等を用いて発現変化の認められる分子を探索した。

(1) TAp63 標的分子の探索とその機能解析

①ケラチノサイト分化における TAp63 および growth differentiation factor 15 (GDF15) の発現解析と発現プラスミドの作製

TAp63 にはカルボキシル末端の長さの異なる 3 種類の isoform が報告されている。そこで、HaCaT 細胞の分化過程において、TAp63 の発現変化を RT-PCR で解析し、発現の変化する isoform を同定した。細胞分化過程における GDF15 の発現を RT-PCR およびウエスタンブロットで調べた。myc-tag を付加した GDF15 の発現プラスミドを作製し、培養細胞へ transfection してウエスタンブロットを行い細胞外への分泌を調べた。また、内在性の GDF15 およびケラチノサイトの分化マーカーである involucrin について、細胞分化時の発現を免疫染色により解析した。

②TAp63 による GDF15 の発現制御の解析

siRNA を用いて TAp63 あるいは Δ Np63 をノックダウンした時の GDF15 の発現を RT-PCR

で解析した。また、TAp63 α の過剰発現時の GDF15 の発現を解析した。2 箇所の p53/p63 結合配列を含む GDF15 遺伝子の転写調節領域を組み込んだレポータープラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイにより、TAp63 による GDF15 の転写活性化を調べた。また、HaCaT 細胞を用いて、レポータープラスミドを安定発現させた細胞株を作製し、細胞分化時に TAp63 をノックダウンしてその転写活性を解析した。次に、2 箇所の p53/p63 結合配列に欠失あるいは mutation を加えたレポータープラスミドを作製したのちプロモーター活性を測定することで、機能的な p63 結合サイトを同定した。

③ケラチノサイト分化における GDF15 の機能解析

siRNA を用いて HaCaT 細胞の GDF15 をノックダウンしたのち、細胞を分化させ、RT-PCR およびウエスタンブロットによりケラチノサイトの分化マーカーである involucrin および keratin10 の発現を解析した。また、その時の増殖マーカーを免疫染色で検出した。

(2) Δ Np63 標的分子の探索とその機能解析

皮膚の創傷治癒過程では Δ Np63 の発現が一過性に低下することが報告されている。一方、matrilin-2 は肝臓や筋組織で損傷後に発現が変化することが報告されていることから、皮膚の創傷治癒への関与を検討した。

①ケラチノサイト傷害における Δ Np63 の発現変化

HaCaT 細胞をコンフルエントまで培養し、細胞を一部削り取って作製した損傷モデルにおいて p63 の発現を免疫染色で調べた。また、HaCaT 細胞に UV-A あるいは UV-B を照射し、ウエスタンブロットにより Δ Np63 の発現を調べた。

②matrilin-2 の上流分子の解析

siRNA を用いて Δ Np63 をノックダウンし、matrilin-2 の発現を RT-PCR で解析した。matrilin-2 遺伝子の転写調節領域配列を調べ、領域内の転写因子結合サイトを検索した。

③BMP-7 による matrilin-2 の発現制御

HaCaT 細胞を BMP-7 で刺激し、matrilin-2 の発現を RT-PCR で解析した。また、BMP シグナリングに関わる Smad4 および Δ Np63 をノックダウンした時の BMP-7 刺激の影響を調べた。matrilin-2 遺伝子の 5'UTR 領域に組み込んだレポータープラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイを用いて、BMP-7 刺激時および Δ Np63 のノックダウン時における matrilin-2 の転写活性化を調べた。

④matrilin-2の機能解析

HaCaT細胞の障害モデルを用いて、 Δ Np63およびmatrilin-2をノックダウンした時のscratch woundへの影響を調べた。また、両分子をノックダウンした時にBoyden chamberを移動する細胞をカルセインで蛍光ラベルし、細胞遊走に与える影響を解析した。

4. 研究成果

HaCaT細胞を用いてp63の標的分子の探索を行った結果、Tap63の下流分子としてGDF15を同定した。また Δ Np63の下流分子としてmatrilin-2を同定した。

(1) Tap63標的分子の探索とその機能解析

①ケラチノサイト分化におけるTap63およびGDF15の発現解析

HaCaT細胞を分化させてRT-PCRを行った結果、Tap63は一過性に発現上昇が認められ、それに伴い、GDF15の発現も上昇した。ウェスタンブロットおよび免疫染色で蛋白質レベルでの解析を行った結果、内在性のGDF15は分化に伴い発現が上昇し、分化マーカーであるinvolucrinが強く染色される細胞での発現が認められた。また、作製した発現プラスミドをtransfectionし、HaCaT細胞へGDF15を過剰発現させた結果、matureな蛋白質の大部分は細胞外へ分泌されることが示された。

②Tap63によるGDF15の発現制御の解析

Tap63のノックダウンによりGDF15の発現は抑制され、Tap63 α を過剰発現させるとGDF15の発現は上昇したことから、GDF15がTap63 α により制御されると考えられた(図1)。レポーターアッセイを行った結果、Tap63 α 量依存的なGDF15の転写活性化が認められた。また、Tap63をノックダウンすると転写活性は阻害された。また2箇所p53/p63結合配列のうち、転写開始点近傍のp53/p63結合配列にmutationを加えた時に転写活性が消失したことから、Tap63によるGDF15の転写活性化には転写開始点近傍の結合サイトが必要であることが示された。

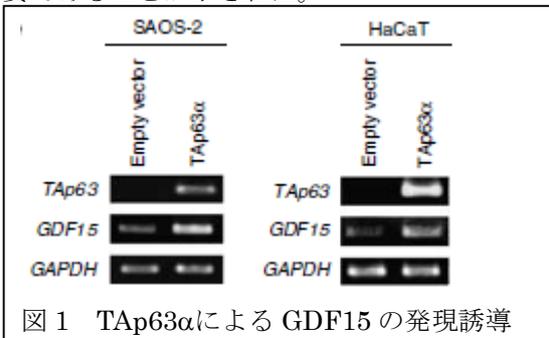


図1 Tap63 α によるGDF15の発現誘導

③ケラチノサイト分化におけるGDF15の機能解析

GDF15をノックダウンしてHaCaT細胞を分化させた結果、分化マーカーであるinvolucrinおよびkeratin10の発現上昇が抑制された(図2)。GDF15の発現が低下すると、分化していない細胞群が増加している可能性を調べるためinvolucrinと増殖マーカーのki67について免疫染色を行った結果、GDF15をノックダウンして分化させた場合には、増殖細胞が多く存在することが示され、GDF15がケラチノサイトの分化過程において重要な役割を担うことが示唆された。

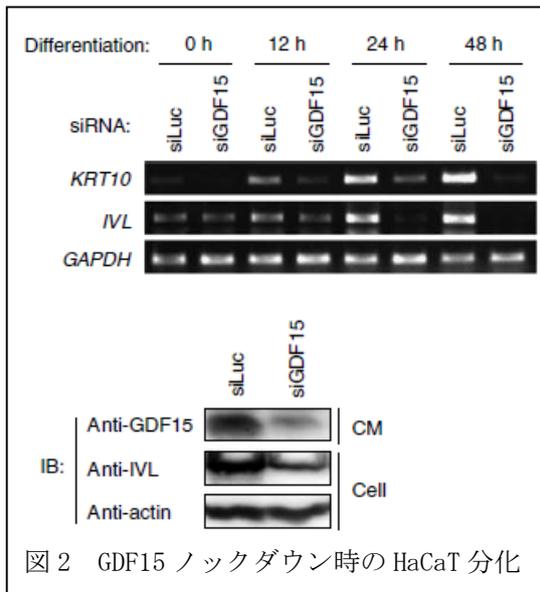


図2 GDF15ノックダウン時のHaCaT分化

GDF15はラット胎児の皮膚で強く発現していることが報告されているが、その機能については明らかになっていなかった。本研究でGDF15がTap63により制御され、表皮分化過程に重要な役割を担っていることを示した。

(2) Δ Np63標的分子の探索とその機能解析

①ケラチノサイト傷害における Δ Np63の発現変化

HaCaT細胞の損傷モデルでは、傷の周囲でp63の発現が一過性に低下する結果が得られた。また、HaCaT細胞にUV-Bを照射した結果、 Δ Np63の発現が低下した。

②matrilin-2の上流分子の解析

HaCaT細胞において Δ Np63をノックダウンするとmatrilin-2の発現が低下したことから、matrilin-2が Δ Np63の下流分子であることが示された。matrilin-2の転写調節領域に存在する転写因子結合配列を検索した結果、BMPシグナルを介する転写因子であるSmadの結合サイトが複数存在したことから、matrilin-2がBMPにより発現制御を受ける可能性が示された。

③BMP-7によるmatrilin-2の発現制御

ΔNp63 の標的分子として BMP-7 が報告されていることから、HaCaT 細胞を BMP-7 で刺激したときの matrilin-2 の発現を解析した結果、matrilin-2 は BMP-7 添加により発現が上昇することが示された。また、この発現上昇は、ΔNp63 および Smad を介する転写活性化に必要な Smad4 をノックダウンすることで阻害された。matrilin-2 遺伝子の転写活性化を測定した結果、BMP-7 の添加により転写活性は上昇し、ΔNp63 のノックダウンにより活性が低下した(図 3)。

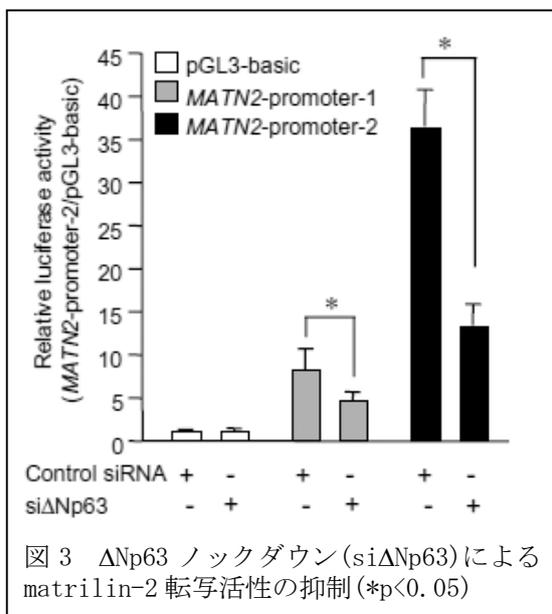


図 3 ΔNp63 ノックダウン (siΔNp63) による matrilin-2 転写活性の抑制 (*p<0.05)

④matrilin-2 の機能解析

matrilin-2 および ΔNp63 をノックダウンして、HaCaT 細胞の scratch wound および細胞遊走に与える影響を解析した結果、両分子のノックダウンで細胞遊走が亢進している結果が得られた。

(1)、(2)の解析から、TAp63 および ΔNp63 の標的分子をそれぞれ同定して機能を示した。これまで、TAp63 のケラチノサイト分化における発現やその下流分子の役割については解析が進んでいなかった。また GDF15 も、遺伝子プロモーター領域に p53/p63 結合サイトがあることから、p53 の標的分子と考えられており、皮膚での役割などについては解析されていなかった。本研究で GDF15 が TAp63 に制御され、細胞分化過程において重要な役割を担うことが示された。これらの結果は、これまで p53 により制御されると考えられている分子も、皮膚においては p63 により発現制御を受け、皮膚の発生や再生に関与する可能性を示している。また、ΔNp63 は皮膚で主に発現する isoform であり、その発現変化は細胞機能に大きく影響すると考えられるが、形成後の皮膚における役割は不明な点が多く残されている。創傷治癒など細胞の遊走

や増殖が必要とされる過程では、ΔNp63 の下流分子の役割が重要と考えられるが、ほとんど解析されていなかった。本研究では、細胞外マトリクス蛋白質である matrilin-2 が創傷治癒過程における細胞遊走に関与する可能性を示した。

また、本研究では標的分子の培養表皮や創傷治療薬への応用を目指して、特に分泌性の分子に着目して探索を行っており、TA-あるいは ΔNp63 の制御下に存在する複数の分子が同定された。皮膚の発生や再生における p63 の機能解析とともに、その標的分子の役割を明らかにすることで早期に臨床応用が期待できる。今回機能解析を行った GDF15 や matrilin-2 を含め、p63 標的分子である分泌性分子の添加、あるいはその抗体や阻害剤により発現量や発現時期を調節することで、創傷治癒過程の促進などを視野に入れた薬剤への応用が期待できる。

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 2 件)

- ① Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A.
DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding, *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 994-1000, 2008、査読有り
- ② Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A.
TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation, *Oncogene*, 27, 409-420, 2008、査読有り

[学会発表] (計 1 件)

- ① 市川 智恵、p63 による GDF15 の発現調節とケラチノサイト分化における機能解析、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、平成 19 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川智恵 (ICHIKAWA TOMOE)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号：60383288