

機関番号：13601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591314

研究課題名 (和文) p53 類似遺伝子 p51/p63 と Maf による表皮細胞の制御機構

研究課題名 (英文) Regulation mechanism in keratinocyte growth and differentiation by p53 homologue p51/p63 and Maf

研究代表者

奥山 隆平 (OKUYAMA RYUHEI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80292332

研究成果の概要 (和文)：

p51/p63 は癌抑制遺伝子 p53 の類似遺伝子であり、発癌に関与すると言われているが、その一方で表皮細胞をはじめとする重層扁平上皮細胞の分化を誘導する。一方、TGFβは上皮細胞の性質を減弱させ、間葉系細胞の性質を増強する働きがある。重層扁平上皮細胞の細胞同士が接着して積み重なる際に、用いられる接着因子デスモプラキンは p51/p63 と TGFβによって、相反する制御を受けていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

p51/p63, a homologue of p53 tumor suppressor, is well known to play a role in oncogenesis. Simultaneously, p51/p63 promotes development of cellular characters specific for squamous cells, such as keratinocytes. Contrast to p51/p63, TGFβ suppresses these cellular characters as squamous cells, which leads to induction of cellular functions specific for mesenchymal cells. We focused on desmoplakin, calcium-dependent homophilic adhesion molecule, because the desmoplakin is a unique molecule in squamous cells. We found that desmoplakin expression is increased by p51/p63 whereas it is decreased by TGFβ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：表皮細胞、p51/p63、シグナル伝達、デスモプラキン、乾癬

1. 研究開始当初の背景

p51/p63 が表皮細胞をどのように制御しているか考えると、p51/p63 が転写因子としての構造を有している点に着目することが重要である。p53 と同様に p51/p63 は DNA 結合領域を有する。最近、p53 によって誘導されるアポトーシス関連遺伝子 Perp が、表皮細胞では p53 でなく p51/p63 によって特異的に

誘導されることが報告された (Ihrie RA *et al. Cell*, 120: 843-856, 2005)。この報告では Perp は表皮細胞のアポトーシスよりむしろ細胞接着に関与し接着因子の1つであるデスモプラキンの発現を制御していた。私たちは p51/p63 が Perp の発現を表皮細胞でどのような機序で調節しているかという点に焦点をあてて解析をはかることとした。

2. 研究の目的

p51/p63 の分化に対する働きが明らかになると、有棘細胞癌や乾癬の病態の解明が進むことが期待される。p51/p63 は遺伝子欠損マウスの解析から表皮の発生に重要な分子であることは明らかであるが、有棘細胞癌や乾癬で発現が亢進していることから病態に深く関わっていると思われる。しかし、これらの疾患で発現が変化しているだけでは、p51/p63 の過剰発現は疾患発症の原因なのか結果なのか、また増殖の異常に関与しているのか分化の異常に関与しているのか、不明である。そこで、実験医学的に p51/p63 の分化に対する働きを明らかにすることが、皮膚疾患の病態の解明に重要であると思われる。さらに解析成果が新しい治療法の開発につながるものと思われた。

3. 研究の方法

マウスより表皮を分離し、初代培養表皮細胞の培養を行った。表皮細胞には、アデノウイルスベクターを用いて、p51/p63 や関連するシグナル伝達分子を遺伝子導入して、その発現を過剰にして、生じた増殖の状態や表皮細胞特異的な分子の発現をウエスタンブロット法や PCR 法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

p51/p63 は癌抑制遺伝子 p53 の類似遺伝子であり、発癌に関与すると言われているが、その一方で表皮細胞をはじめとする上皮細胞の制御にも関わっている。研究のスタート時に着目した転写因子 Maf に関して、p51/p63 との関連を示す実験結果を解析で得ることはできなかった。しかし、前年度までの解析で p51/p63 がカドヘリンファミリーの接着因子であるデスモプラキンの発現をプラスに制御することを見出した。これとは逆の作用として、デスモプラキンの発現をマイナスに制御する作用を TGFβ が持つことも見出した。そこで、そのメカニズムの解明を試みた。

p51/p63 は AP-1 の活性化をはかる働きがあるが、AP-1 を介してデスモプラキンの発現が調節されている訳ではなかった。一方、TGFβ のシグナルは Smad を介して伝達されるので、Smad に着目した。ウイルスベクターを用いて Smad3 を過剰発現するとデスモプラキンは減少し、一方 siRNA を用いて Smad3 を減少させるとデスモプラキン増加することがわかった。Smad3 と類似した作用を有する Smad2 では、同様の変化はみられなかった。よって、TGFβ は Smad3 を介してデスモプラキンの発現を負に制御してい

ることがわかった。

デスモプラキン以外の接着因子に関しても同様の機序があるのかは明らかではないが、細胞接着に関して p51/p63 と Smad3 が相対する作用を有することから、核内でこの 2 つの因子が何らかの関連を持って働いていることが予想された。表皮細胞をはじめとする上皮細胞は、細胞同士が隙間なく接着してシートを形成している。しかし、創傷治癒や癌転移などの際には細胞接着が弱まり、間葉系細胞のようにバラバラになり 1 個 1 個の細胞として存在するようになる。このような変化を上皮—間葉転換と呼ぶが、この変化は p51/p63 と Smad3 の相互の働きが背景にあるのではないかと考えた。

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 71 件)

1. Hirakawa S, Saito R, Ohara H, Okuyama R, Aiba S. Dual oxidase 1 (DUOX1) induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of PTP1B in human epidermal keratinocytes. *J Immunol* 186: 4762-4770, 2011.
2. Ogawa E, Owada Y, Ikawa S, Adachi Y, Egawa T, Nemoto K, Suzuki K, Hishinuma T, Kawashima H, Kondo H, Muto M, Aiba S, Okuyama R. Epidermal FABP (FABP5) regulates keratinocyte differentiation via 13(S)-HODE-mediated activation of the NF-κB signaling pathway. *J Invest Dermatol* 131: 604-612, 2011.
3. Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RCM, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the *SHOC2* gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *J Hum Genet* 55: 801-809, 2010.
4. Minagawa A, Koga H, Takahashi M, Sano K, Okuyama R. Dermoscopic features of non-pigmented eccrine poromas in association with their histopathological features. *Br J Dermatol* 163: 1264-1268, 2010.
5. Okada S, Muto A, Ogawa E, Nakanome A, Katoh Y, Ikawa S, Aiba S, Igarashi

- K, Okuyama R. Bach1-dependent and -independent regulation of heme oxygenase-1 in keratinocytes. *J Biol Chem* 285: 23581-23589, 2010.
6. Ikehata H, Okuyama R., Ogawa E., Nakamura S, Usami A, Mori T, Tnataka K, Aiba S, Ono T. Influence of p53 deficiency on the apoptotic response, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis* 25: 397-405, 2010.
 7. Takayama M, Fujita R, Suzuki M, Okuyama R., Aiba S, Motohashi H, Yamamoto M. Genetic analysis of hierarchical regulation of Gatal and NF-E2 p45 gene expression in megakaryopoiesis. *Mol Cell Biol* 30: 2668-2680, 2010.
 8. Ohara H, Saito R, Hirakawa S, Shimada M, Mano N, Hishinuma T, Okuyama R., Aiba S. Gene expression profiling defines the role of a danger signal ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation. *J Dermatol Sci* 58: 143-151, 2010.
 9. Numata I, Okuyama R., Memezawa A, Ito Y, Takeda K, Furuyama K, Shibahara S, Aiba S. Functional expression of heme-oxygenase-1 in human differentiated epidermis and its regulation by cytokines. *J Invest Dermatol* 129: 2954-2603, 2009.
 10. Ohta M, Okuyama R., Ogawa E., Kisu K, Sato H, Aoki M, Aiba S. Cutaneous accumulation of abnormal polyglutamine proteins of patients with dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Eur J Neurol* 16: 1246-1249, 2009.
 11. Okuyama R., Ogawa E., Egawa T, Nagoshi H, Tagami H, Ikawa S., Aiba S. Ectopic expression of the p53 homologue p63 is linked to squamous metaplasia in extramammary Paget's disease with invasive adenocarcinoma. *Histopathology* 54: 378-381, 2009.
 12. Okuyama R., Ogawa E., Egawa T, Nagoshi H, Obinata M, Tagami H, Ikawa S., Aiba S. p63-induced onset of keratinocyte differentiation via the c-Jun-N terminal kinase pathway is counteracted by keratinocyte growth factor. *J Biol Chem* 283: 34241-34249, 2008.
 13. Mohrii Y, Kato S, Umezawa A, Okuyama R., Nishimori K. Impaired hair placode formation with reduced expression of hair follicle-related genes in mice lacking Lgr4. *Dev Dyn* 237: 2235-2242, 2008.
 14. Memezawa A, Okuyama R., Tagami H, Aiba S. p63 constitutes a useful histochemical marker for Pagetoid Bowen's disease to be differentiated from extramammary Paget's disease. *Acta Derm Venereol* 88: 619-620, 2008.
 15. Fujimura T, Okuyama R., Ito Y, Aiba S. Profiles of FOXP3 regulatory T-cells (Tregs) in dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *British J Dermatol* 158: 1256-1263, 2008.
 16. Okuyama R., Ogawa E., Ikawa S, Nagoshi H, Egawa T, Kurihara A, Yabuki M, Tagami H, Obinata M, Aiba S. p51/p63 inhibits ultraviolet B-induced apoptosis via Akt activation. *Oncogene* 27: 848-856, 2008.
 17. Okuyama R., Tagami H, Aiba S. Notch signaling: its role played in the epidermal homeostasis and in the pathogenesis of the skin diseases. *J Dermatol Science* 49: 187-194, 2008.
- [学会発表] (計 61 件)
1. 奥山隆平 皮膚科の診療と基礎研究の発展的な融合を目指して 日本皮膚科学会東北 6 県合同地方会 仙台 2/4/2011
 2. 奥山隆平 p63 functions: Its role in keratinocyte regulation and cross-talk with Notch 鳥取大学染色体工学研究センターセミナー 米子 1/20/2011.
 3. Sakaizawa K, Goto Y, Takata M, Okuyama R. Mutations of KIT and BRAF in circulating tumor cells isolated from peripheral blood of melanoma patients. Melanoma 2010 congress. Sydney, Australia, November 4-7, 2010.
 4. Kiniwa Y, Takazawa Y, Okuyama R. Antigen specific immune response against WT1 in melanoma patients. Melanoma 2010 congress. Sydney, Australia, November 4-7, 2010.
 5. Goto Y, Kiniwa Y, Sakaizawa K, Uchiyama A, Koga H, Takata M, Okuyama R. Activation of toll-like receptor 4 on human melanoma cells induced cell

- proliferation and migration. Melanoma 2010 congress. Sydney, Australia, November 4-7, 2010.
6. **奥山隆平** 乾癬：病態の解析から治療法の開発へ 日本皮膚科学会青森地方会盛岡 9/26/2010.
 7. **奥山隆平** 乾癬の表皮細胞では何が起きているのか？ 日本皮膚科学会総会 教育講演 大阪 4/17/2010.
 8. Okuyama R, Saito R, Ogawa E, Ikawa S, Aiba S. Notch2 down-regulation in wound healing is contributed to acceleration of cell motility. 日本研究皮膚科学会 福岡 12/4-6/2009.
 9. Ogawa E, Okuyama R, Okada S, Ikawa S, Aiba S. p63 prevents growth arrest via sonic hedgehog induction. 日本研究皮膚科学会 福岡 12/4-6/2009.
 10. 池畑広伸、小野哲也、**奥山隆平**、相場節也 UVB照射マウス皮膚表皮にみられる「変異誘発抑制」応答の機構解明 日本放射線影響学会 広島 11/12/2009.
 11. **奥山隆平** 教育講演 関節症性乾癬：いかに診断し治療を進めるか 日本皮膚科学会総会 福岡 2/25/2009
 12. **Okuyama R**, Mohri Y, Kato S, Ogawa E, Matsuo T, Umezawa A, Nishimori K, Aiba S. LGR4 deletion induces eye open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility. International Investigative Dermatology 2008. Kyoto, Japan, May 14-17, 2008.
 13. Fujimura T, **Okuyama R**, Hidaka T, Ito Y, Aiba S. Profiles of Foxp3+ regulatory T-cells (Tregs) in Bowen's disease and squamous cell carcinoma. International Investigative Dermatology 2008. Kyoto, Japan, May 14-17, 2008.

[図書] (計9件)

1. **奥山隆平**：水疱性類天疱瘡、膿瘡、発赤、面皰、痒疹 南山堂医学大事典 in press.
2. **奥山隆平**：乾癬と妊娠 皮膚科臨床インサイト in press.
3. 秋山徹、**奥山隆平** 河府和義編：完全版 マウス・ラット 疾患モデル活用ハンド

- ブック 2011.
4. 木庭幸子、**奥山隆平**：紅皮症 病気と薬 パーフェクトBOOK p1370-1373 2011.
 5. 木庭幸子、**奥山隆平**：光線過敏症 病気と薬 パーフェクトBOOK p1393-1397 2011.
 6. **脂漏性皮膚炎・ふけ症** 今日の治療指針 pp1020 2011.
 7. **鶏眼・胼胝** 今日の治療指針 pp991 2010.
 8. 酒皰様皮膚炎 口囲皮膚炎 今日の治療指針 pp906 2009.
 9. 凍瘡 今日の治療指針 pp880 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 隆平 (OKUYAMA RYUHEI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80292332

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

井川 俊太郎 (IKAWA SHUNTARO)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号：50241576

小川 英作 (OGAWA EISAKU)
信州大学・医学部・助授
研究者番号：20451586