

平成 22 年 3 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790800

研究課題名 (和文) 皮膚疾患および病態における核移行シグナルの役割

研究課題名 (英文) A role of nuclear import activity on the pathomechanism of cutaneous diseases

研究代表者

梅垣 知子 (UMEGAKI NORIKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80397629

研究成果の概要 (和文)：

核移行シグナルである karyopherin  $\alpha$ 2 (KPNA2) が細胞増殖に関して果たす役割について、HaCaT 細胞において TAP (tandem affinity purification) method および mass spectrometry を行い、KPNA2 が結合し核移行を行っているタンパク群を特定、解析。また、乾癬や有棘細胞癌をはじめとする皮膚悪性腫瘍での KPNA2 の発現を免疫染色にて確認し、表皮細胞の増殖との関連を検討。

研究成果の概要 (英文)：

Detection and analysis of target proteins imported by karyopherin alpha 2 (KPNA2) in HaCaT cells using tandem affinity purification method and mass spectrometry to investigate the roles of KPNA2 in the cell growth. Immunohistochemical staining using anti-KPNA2 antibody was performed in the skin diseases including psoriasis and squamous cell carcinomas to demonstrate the relationship between KPNA2 and keratinocyte proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：核移行シグナル、karyopherin  $\alpha 2$ 、TAP methods, mass spectrometry

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞の増殖と分化に関わる細胞外刺激を核に伝達するシグナル伝達の分子機構解析が目覚ましい。またヒト正常表皮細胞においても増殖・分化に関与する転写因子などの解明が進む中、これらシグナルの核膜通過制御機構の詳細については未だ不明な点が多い。これまでの研究において、karyopherin alpha 以下 KPNA のサブユニットのうち、KPNA2 の発現量のみがインターフェロン $\gamma$ や TGF- $\beta$  といった表皮の分化・増殖に影響を与えるサイトカインによって制御を受けており、さらに表皮角化細胞を用いて KPNA2 を強発現させた系もしくは siRNA を用いてノックダウンした系に対してマイクロアレイにて表皮の分化・増殖にかかわる因子を比較検討したところ、ケラチン 16 をはじめとして、乾癬などの表皮の異常な分化・増殖によって発現することが知られているタンパク質の発現の制御にかかわっている可能性が示唆された。さらに最近の報告では乳がんや悪性黒色腫などの悪性腫瘍において KPNA2 の発現が上昇しており、KPNA2 がこれらの癌の予後因子として有用である可能性も考えられている。

### 2. 研究の目的

本研究は、表皮細胞の増殖・分化を制御する分子機構における核内能動輸送蛋白 KPNA の役割を解明し、その異常による皮膚病態を解明すると共に、新たな治療法開発へとつなげる事を目的としている。具体的には、乾癬や

有棘細胞癌といった表皮細胞の増殖・分化が破綻している皮膚疾患群の病態を、KPNA が関連する分化・増殖の制御性転写因子の核膜通過システム異常という新しい視点から明らかにする。さらに、その核膜通過システム異常の原因となっている KPNA の発現を制御する方法論を開発し、表皮細胞の異常増殖・異常分化を正常化するための新しい治療法開発を最終的な目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫染色

これまでの研究成果を踏まえて、皮膚生検組織を用いて KPNA 各サブユニットおよび核外移行シグナルである CRM1 と karyopherin beta1 (KPNB1) の免疫染色を各抗体を用いて行った。

#### (2) Western blot

さらに細胞増殖における核移行シグナルの果たす役割について検討を行った。細胞増殖の際に KPNA2 の発現が上昇する詳細なメカニズムを調べるため、1%FBS を含む DMEM 培地で HaCaT 細胞を培養し、細胞増殖を促進させるサイトカインである EGF (0, 2, 20 ng/ml), HGF (0, 2, 20 ng/ml), TGF- $\beta$  (0, 2, 10 ng/ml) をそれぞれ培地に添加して 24 時間後に細胞を回収した。ウェスタンブロットにてタンパク発現量を検討した。

#### (3) TAP (tandem affinity purification) method

また、細胞増殖が活性化している状態において、どのような転写因子が KPNA2 の働きによって実際に核へ移行し増殖を維持させているのかについて、細胞内でのタンパク結合を解析することから明らかにするため、TAP (tandem affinity purification) method を用いて HaCaT 細胞内で KPNA2 と結合するタンパクを分離・精製した。TAP method は 2 段階の精製過程を行うことにより、網羅的かつ特異的なタンパク結合を特定することが可能となる手法である。まず、HaCaT 細胞における stably expressing KPNA2 with a C-terminal TAP-epitope tag (KPNA2-TAP) の作成を行い、コントロール用として、HaCaT 細胞における GFP-TAP stable cell line を作成した。方法として pENTER/SD/D-TOPO vector (Invitrogen) に組み込んだ KPNA2 で Gateway を用いた LR 反応を行い、大腸菌にトランスフォーメーションさせて増やした後、カルベニシリンで select したコロニーを拾い、KPNA2-TAP を作成した。その後培養 HaCaT 細胞に electroporation によって導入し、puromycin で select しながらコロニーを拾い、KPNA2-TAP stable cell line を確立。これらを細胞数  $1 \times 10^6$  培養し、TAP method を用いて KPNA2 と結合するタンパクを回収・精製し、SDS-PAGE で展開した後銀染色を行い、コントロールと比較して、KPNA2 と特異的に結合するバンドを特定。さらにトリクロロ酢酸を用いてタンパク質濃縮を行い、もう一度銀染色の後、バンドを切り出し、LC-mass spectrometry を施行。

#### (4) si RNA を用いた KPNA2 発現抑制による増殖への影響の検討

最後に KPNA2 の発現を siRNA を用いてノックダウンした時に、細胞増殖に与える影響について検討した。HaCaT 細胞を抗生剤 free の

10%FBS 含有 DMEM で培養し、トリプシンを用いて細胞を回収し、PBC で洗浄して  $1 \times 10^5$  個に調節する。si KPNA2 を 50pmol 使用して、マイクロポレーションを用いて導入し、抗生剤 free の 10%FBS 含有 DMEM 培地  $500 \mu\text{l}$  内に入れて 24well プレートで培養。24 時間後、48 時間後に細胞を回収して KPNA2 の発現が十分に抑制されていることを確認。細胞数をカウントし、また同時に (96well を用いて) MTS アッセイを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫染色結果

KPNA1-5, CRM1, KPNB1 のうち、KPNA2 が乾癬において基底層で発現が上昇しており、有棘細胞癌、ボーエン病、Paget 病や悪性黒色腫などの皮膚悪性腫瘍においても KPNA2 の発現上昇が確認された。悪性腫瘍においては基底層のみならず、上層細胞にまでランダムに KPNA2 の発現増加と核内移行の像が確認され、KPNA2 の発現の制御機序が破綻することが、皮膚悪性腫瘍における腫瘍性増殖のメカニズムに関与している可能性も考えられた。現在各疾患ごとに KPNA2 が強発現している細胞数をカウントして、予後との関連をしらべながら有意差検定を行っている。

### (2) Western blot 結果

EGF, TGF- $\beta$  刺激では・P・P・P・のタンパク発現量に変化は見られなかったが、HGF 刺激において細胞増殖のマーカーである PCNA の増加とともに KPNA2 の発現量増加が確認された。そこで、HGF 刺激によって起こる一連のシグナル伝達系が KPNA2 発現に大きく関与しているのではないかと考え、現在 KPNA2 のプロモーター領域についてデータベースをもとに解析し、KPNA2 発現をコントロールしている転写因子の検討を加えている。

(3) TAP (tandem affinity purification) method

LC-mass spectrometryにてターゲットタンパクを同定。現在同定し得たタンパクの解析をさらに追加して行い、細胞増殖と関連したKPNA2の果たす役割について検討を加えている。

(4) si RNAを用いたKPNA2発現抑制による増殖への影響の検討

KPNA2の発現抑制は十分であったものの、細胞数のカウントおよびMTSアッセイでも再現性のある明らかな細胞増殖の抑制は見られず、KPNA2の発現抑制によって、他のKPNAが相補して細胞増殖機能を維持している可能性が示唆された。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 4件)

1. Hanafusa T, Umegaki N, Ymaguchi Y, Katayama I Good's syndrome (hypogammaglobulinemia with thymoma) presenting intractable opportunistic infections and hyperkeratotic lichen planus. Journal of Dermatology, 2010, 37: 171-174 査読有

2. Nakano H, Nakamura Y, Kawamura T, Shibagaki N, Matsue H, Aizu T, Rokunohe D, Akasaka E, Kimura K, Nishizawa A, Umegaki N, Mitsuhashi Y, Shimada S, Sawamura D. Novel and recurrent nonsense mutation of the SLC39A4 gene in Japanese patients with acrodermatitis enteropathica. Br J Dermatol. 2009, 161(1):184-6 査読有

3. 強皮症様症状を呈し、突然死した全身性アミロイドーシスの1例:梅垣知子、長澤智彦、大畑千佳、中村敏明、片山一郎、西本憲弘、光定伸浩 臨床皮膚科 2009, 63(12)940-4 査読無

4. 室田浩之、北場俊、谷守 金田眞理 梅垣知子、片山一郎 かゆみを伴う皮膚疾患患者での労働生産性の評価とヒスタミン H1拮抗薬による改善効果の検討 Progress in Medicine, 2009, 29: 1842-1848 査読有

[学会発表] (計 1件)

1. 梅垣知子、吉良正浩、片山一郎、緒方篤 ヒト化抗IL-6受容体モノクローナル抗体(アクテムラ)療法を試みた関節症性乾癬の1例 24回乾癬学会学術大会 平成21年9月4日(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅垣 知子 (UMEGAKI NORIKO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80397629

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：