

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591453

研究課題名（和文） 上皮-間葉転換（EMT）誘導による新しい創傷治療戦略の開発

研究課題名（英文） Development of the new wound medical treatment strategy by induction of epithelial mesenchymal transition(EMT)

研究代表者

会津 隆幸（AIZU TAKAYUKI）

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00400135

研究成果の概要（和文）：ラットの背部に潰瘍を形成し、ヒト細胞において検討した Snail の siRNA と DNA decoy を用いた動物での潰瘍治療実験を行った。その結果、上皮-間葉転換を調節するマスター遺伝子である転写因子の Snail を抑制することで皮膚潰瘍の縮小効果や各種遺伝子発現に変化がみられる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The ulcer was formed behind the rat and the ulcer treatment experiment for the animal using siRNA and DNA decoy of Snail which were examined in the human cell was conducted. As a result, a possibility that the contractionary effect of a skin ulcer and the various gene expression by suppressing Snail of the transcription factor which is a master gene which adjusts epithelial mesenchymal transition would change was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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：上皮-間葉転換、Snail、創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

特定の臓器は大きく上皮系と間葉系の細胞から構成され、皮膚では表皮細胞と線維芽細胞がそれに当てはまる。上皮系の細胞は一般に細胞同士が密に接着し基底膜の上にシート状に配置するが、一方間葉系の細胞は不規則な形態で細胞同士の接着がすくなく自由に行動できる。近年、個々の細胞がこの上皮と間葉の2種類の形態を相互に転換させ

ていることが明らかとなり、この上皮-間葉転換（EMT）は生物の器官形成や形態変化に非常に重要であることも示されてきた。

さらに、ごく最近の多くの研究からこのEMTにおいて、zinc-finger型転写因子であるSnailがこの現象を調節するマスター遺伝子となっていることが解明された(図1)。

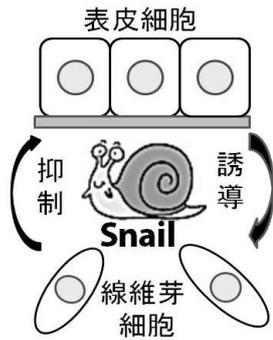


図1 上皮-間葉転換 (EMT)

すなわち、この転写因子の発現が抑制されると間葉から上皮への転換のスイッチが入り、細胞接着を担うカドヘリンやオクルジンなどの発現が強まり、ファイブロネクチンやメタロプロテナーゼの発現が減少する。逆に、Snail の発現が誘導されると上皮から間葉に細胞が向う。

創傷治癒は近年注目される分野で、特に皮膚科領域では、褥瘡、下腿潰瘍、熱傷、手術創と深い関連がある。特に、深い潰瘍の場合(図2)、上皮化は周囲からの表皮から起こるため時間がかかるし、またポケットを形成すると周囲からの上皮も難しく、新しい観点からの治療法の開発が望まれている。

この創傷治癒には表皮細胞も線維芽細胞も参加するが、現在非常に注目される現象である EMT を皮膚の潰瘍の治療に応用した詳細な研究は今までにない。

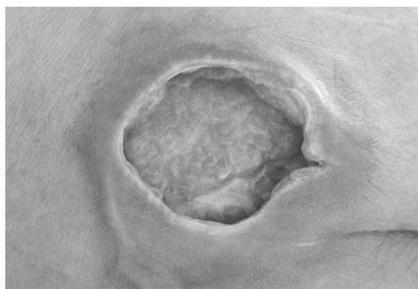


図2 上皮化が遅れる皮膚潰瘍

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、EMT のマスター転写因子で

ある Snail の発現を強力にノックダウンすることにより、皮膚潰瘍底にある線維芽細胞から表皮細胞を直接作り出す画期的な治療法を開発することにある(図3)。

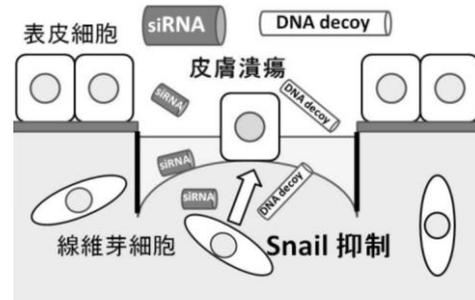


図3 新しい創傷治療戦略

その目的のために、以下の3つの実験を行う。

### (1) 正常皮膚や皮膚潰瘍状態の転写因子 Snail の発現

培養表皮細胞や線維芽細胞にて RT-PCR やウェスタンブロットを用いて Snail の発現やリン酸の状態を見る。また、正常皮膚や潰瘍皮膚などでも確認する。

### (2) Snail の強発現とノックダウン

Snail 遺伝子や Snail の分解酵素である glycogen synthetase kinase-3 遺伝子を導入することにより、その強発現と抑制状態を再現し、各種の遺伝子発現や細胞状態を観察する。

### (3) 治療実験

最後に Snail の siRNA と DNA decoy を作成し、それらを投与することにより培養線維芽細胞から表皮細胞への転換を試みる(図3)。さらに、動物に潰瘍を形成し、それらの薬剤での治療実験を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常皮膚での Snail の発現

①培養表皮細胞と線維芽細胞から RNA を採取し RT-PCR にて Snail の遺伝子発現、また蛋白を採取しウェスタンブロットで蛋白発現を確認する。類似する E-box に結

合する zinc-finger 型転写因子として、Slug, Twist があるのでその発現も見る。

②正常皮膚においても免疫組織化学に用いる抗体が入手可能であるので、その局在も検討する。

## (2) 皮膚潰瘍部での Snail の発現

①次に本研究の対象疾患である皮膚潰瘍での Snail 発現を検討する。我々はすでに褥瘡、糖尿病性潰瘍、熱傷、手術創などの表皮と真皮から RNA と蛋白を得ているが、さらに多くの患者からサンプルを得る。

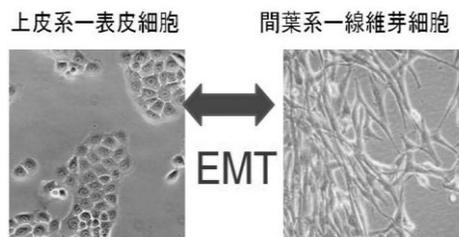
②また、RT-PCR とウエスタンブロットで Snail の発現やリン酸化の状態を見る。

③組織学的にも Snail 抗体を用いて検討する。

## (3) Snail の強発現系での検討

①Snail の cDNA を構築し、ベクターに挿入し発現ベクターを構築する。さらに、テトラサイクリンでの誘導可能な発現ベクターも作成する。

②表皮細胞や線維芽細胞に通常発現ベクターを一時的に導入し表皮細胞の発現マーカーであるカドヘリン群、インテグリン群、VII 型コラーゲン、トランスグルタミナーゼ、線維芽細胞のマーカーであるファイブロネクチン、メタロプロテナーゼ群、I、III 型コラーゲンの発現を RT-PCR で測定する。また、上皮系細胞と間葉系細胞の形態の変化も見る (図 4)。



遺伝子導入による細胞の形態の変化

図 4

③さらに、発現誘導の系でも表皮細胞や線維芽細胞の細胞株で stable の系を作成する。さらにテトラサイクリンでの Snail 誘導前後でも、それらの細胞で遺伝子発現や形態の変化を見る。

## (4) Snail の抑制系での検討

①Snail は核内で glycogen synthetase kinase-3 (GSK3) からのリン酸化を受けると細胞質に移動して分解される。そのため、GSK3 を強発現することにより Snail の発現を抑制できる。そこで、GSK3 の発現ベクターを作成する。さらに、テトラサイクリンで誘導できる細胞株も作成する。

②表皮細胞や線維芽細胞に導入し上記した遺伝子の発現を RT-PCR で測定する。また、細胞形態の変化も見る。

③同様にテトラサイクリンの誘導の系でも検討する。

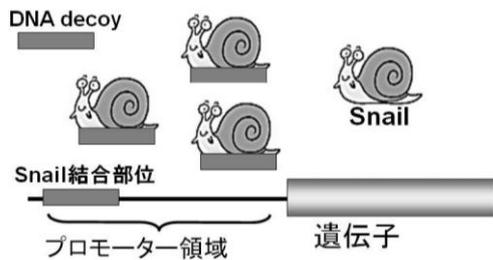
## (5) siRNA の in vitro での実験

①上記抑制の系は遺伝子ベクターの導入があるため臨床応用には難しい、そこで siRNA の実験を行う。種々の配列の siRNA を少量作成し、導入試薬にて培養表皮と線維芽細胞へ導入し Snail 発現抑制効果を見る。

②Snail のノックダウン効率のよい siRNA をバルクで作成し、培養細胞に導入する。導入後、上記した遺伝子群の発現や細胞の形態を観察する。

## (6) DNA decoy の in vitro での実験

①Snail の特異的 DNA 結合部位を含むオリゴ DNA を種々作成する。これらが細胞に入ると Snail と結合し decoy (おとり) となり、Snail のプロモーターへの結合が抑制される (図 5)。



DNA decoyによるSnailのDNA結合の阻害

図5

②Snail のノックダウン効率のよい DNA decoy を同様にバルクで作成する。その後、培養細胞に導入し、特定の遺伝子群の発現や細胞の形態を観察する。

#### (7) 動物での潰瘍治療実験

①Snail 転写因子の配列はかなり保存されているので、ヒト細胞で検討した siRNA と DNA decoy で治療実験を行う。

②ラットの背部に潰瘍を形成し、そこに Snailのノックダウン効率の良かった siRNA と DNA decoy を外用する。経時的に、皮膚を採取し各種遺伝子発現、潰瘍の縮小の程度を検討する。

③もし、ヒト用の siRNA と DNA decoy で問題があれば、ラットの細胞の系で配列を検討し、動物実験まで発展させる。

#### 4. 研究成果

まず正常皮膚での Snail の発現を確認するため、培養表皮細胞と線維芽細胞から、RNA を採取し、RT-PCR にて Snail の遺伝子発現を確認。また、蛋白を採取しウエスタンブロットで蛋白発現を確認した。正常皮膚においても免疫組織化学に用いる抗体による染色で局在を検討した。次に本研究の対象疾患である皮膚潰瘍での Snail 発現を検討するため、褥瘡患者の患部組織の表皮および真皮から得られた RNA と蛋白を用いて RT-PCR とウエスタンブロットで Snail の発現やリン酸化の状態をみた。また、組織学的にも Snail 抗体を

用いて局在等を検討した。Snail の強発現系での細胞への影響をみるため、Snail の cDNA を構築し、ベクターに挿入し発現ベクターを作成した。さらに、テトラサイクリンでの誘導可能な発現ベクターも作成し、表皮細胞や線維芽細胞に通常の発現ベクターを一時的に導入したのち表皮細胞の発現マーカーであるカドヘリン群、インテグリン群、VII 型コラーゲン、トランスグルタミナーゼ、線維芽細胞のマーカーであるファイブロネクチン、メタロプロテナーゼ群、I、III 型コラーゲンの発現を RT-PCR で測定した。次に、上皮系細胞と間葉系細胞の形態の変化を観察。さらに、発現誘導の系でも表皮細胞や線維芽細胞の細胞株で stable の系を作成し、さらにテトラサイクリンでの Snail 誘導前後で、それらの細胞の遺伝子発現を検討した。Snail の siRNA の in vitro での実験と DNA decoy の in vitro での実験を検討した。種々の配列の siRNA を少量作成し、導入試薬にて培養表皮と線維芽細胞へ導入し Snail 発現抑制効果を調べた。Snail のノックダウン効率のよい siRNA をバルクで作成し、培養細胞に導入を検討した。導入後、上記した遺伝子群の発現や細胞の形態を検討した。Snail の特異的 DNA 結合部位を含むオリゴ DNA を種々作成した。これらが細胞に入ると Snail と結合し decoy (おとり) としての機能を検討した。Snail のノックダウン効率のよい DNA decoy を同様にバルクで作成し、培養細胞に導入し、特定の遺伝子群の発現や細胞の形態を検討した。その結果、Snail の発現をコントロールすることにより、角化細胞や線維芽細胞の形態が変化することがわかった。Snail 転写因子の配列はかなり保存されていることより、ヒト細胞で検討した Snail の siRNA と DNA decoy を用いた動物での潰瘍治療実験を行った。ラットの背部に潰瘍を形成し、そこ

に Snail のノックダウン効率の良かった siRNA と DNA decoy を含有した外用剤を塗布した。その後経時的に皮膚を採取して各種遺伝子発現、潰瘍の縮小の程度を検討した。その結果、遺伝子発現や潰瘍の縮小効果に変化がみられ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3件)

- ① Takemoto H, Tamai K, Akasaka E, Rokunohe S, Takiyoshi N, Umegaki N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D.

Relation between the expression levels of the POU transcription factors Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation.

J Dermatol Sci. 2010;60(3) : 203-205.

査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.10.006>

- ② Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E, Kimura K, Takiyoshi N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Matsuzaki Y, Tsuchida S, Sawamura D.

Raf kinase inhibitor protein expression correlates with differentiation but not with ERK phosphorylation in cutaneous squamous cell carcinoma.

J Dermatol Sci. 2010;60(3) : 199-201.

査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.10.005>

- ③ Kimura Y, Kaneko T, Akasaka E, Nakajima K, Aizu T, Nakano H, Sawamura D.

Multiple eruptive dermatofibromas associated with Hashimoto's thyroiditis and myasthenia gravis.

EUR J Dermatol, 2010 : 20(4) : 1-2.

査読有

Doi:10.1684/ejd.2010.0981

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

会津 隆幸 (AIZU TAKAYUKI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00400135

### (2) 研究分担者

中野 創 (NAKANO HASJIME)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90281922

澤村 大輔 (SAWAMUERA DAISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60196334

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：