

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791055

研究課題名(和文) 上皮-間葉転換のマスター転写因子による基底膜蛋白の発現調節

研究課題名(英文) Expression regulation of basement membrane proteins by transcription factor of epithelial to mesenchymal transition

研究代表者

中島 康爾 (NAKAJIMA KOJI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70374832

研究成果の概要(和文)：近年の研究から、transforming growth factor-beta (TGF-β) がこの epithelial to mesenchymal transition (EMT) のキーとなるサイトカインであることが判明した。さらに、ごく最近の研究から zinc-finger 型転写因子である Snail がこの EMT 現象を調節するマスター転写因子となっていることが解明された。申請者の所属する弘前大学皮膚科では基底膜に発現する分子の発現調節機構の研究に力点をおいてきた。申請者も実際に表皮細胞の基底膜を構成する bullous pemphigoid antigen 1 (BPAG1) や VII 型コラーゲンのプロモーターの解析を行っている。本研究の目的は TGF-β のシグナルで誘導される転写因子 Snail がどのような分子機構を介して表皮細胞での基底膜蛋白の発現を変化させるのか、を明らかにすることにある。その結果、TGF-β は基底細胞で発現する基底膜蛋白の発現を誘導することが明らかとなり、EMT を抑制することが分かった。また、その現象に転写因子 Snail が深く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies show that TGF-β is a key cytokine of EMT and zinc-finger transcription factor Snail also is a master transcription factor of EMT. Our group has been investigating on molecular mechanisms of expression regulation of basement membrane proteins and examining promoter analysis of BBAG1 and type VII collagen genes. The purpose of this study is to clarify how transcription factor Snail induced by TGF-β modulate expression of basement membrane proteins. The results showed that TGF-β induced expression of basement membrane proteins, resulting in suppression of EMT. Furthermore, transcription factor Snail played an important role in this phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：遺伝子、シグナル伝達、発現制御、転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は大きく上皮系と間葉系に分けられるが、皮膚では表皮細胞と線維芽細胞がそれに当てはまる。近年、個々の細胞がこの上皮から間葉系の細胞に転換する現象が明らかとなり、この現象が epithelial to mesenchymal transition (EMT) と呼ばれるようになった。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が明らかにされているが、さらに癌や炎症性疾患の病態にも密接に関連していることが示されてきた。近年の研究から、transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )がこのEMTのキーとなるサイトカインであることが判明した。さらに、ごく最近の研究から zinc-finger 型転写因子である Snail がこの EMT 現象を調節するマスター転写因子となっていることが解明された。申請者の所属する弘前大学皮膚科では基底膜に発現する分子の発現調節機構の研究に力点をおいてきた。申請者も実際に表皮細胞の基底膜を構成する bullous pemphigoid antigen 1 (BPAG1) や VII 型コラーゲンのプロモーターの解析を行っている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、1) TGF- $\beta$ のシグナルで誘導される転写因子 Snail がどのような分子機構を介して表皮細胞での基底膜蛋白の発現を変化させるのか、また2) 基底膜分子が関与する細胞の基底膜への接着や遊走に Snail 発現がどのように影響するか、の2点を明らかにすることにある。

### 3. 研究の方法

1) 基底膜遺伝子のプロモーター解析:BPAG1 遺伝子と VII 型コラーゲン遺伝子プロモーターのいろいろな長さの調節領域をルシフェラーゼ遺伝子に結合したコンストラクトを用いた。ヒト正常表皮細胞を培養し、それらのコンストラクトを表皮細胞に導入した後、TGF- $\beta$ を添加してルシフェラーゼの活性を測定した。

2) 転写因子 Snail の結合部位の同定:ルシ

フェラーゼアッセイから推測された領域からコンピュータープログラムにて Snail 結合部位の候補を推測した。BPAG1 プロモーター上の結合候補部位と同様の相補的なオリゴヌクレオチドを合成した。それらのオリゴヌクレオチドを2本鎖の状態で行った。

3) シグナル伝達の解析: 今回の研究でどのシグナル伝達が働いているかを詳細に検討するのは難しいので阻害剤を用いた実験を行った。ヒト正常表皮細胞を培養し、反応部位を持つコンストラクトを表皮細胞に導入し、その後、Akt キナーゼシグナル阻害剤 (PI3K, PDK1, Akt 阻害), MAP キナーゼ阻害剤 (ERK, p38, JNK 阻害) と TGF- $\beta$ を添加してルシフェラーゼの活性を測定した。

4) Snail の強発現系での検討: Snail の cDNA を構築し、発現ベクターに挿入し発現ベクターを構築した。さらに、テトラサイクリンでの誘導可能なベクターも作成した。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の発現の変化を RT-PCR で測定した。同時に、その逆の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も RT-PCR で確かめた。さらにテトラサイクリンでの Snail 誘導前後でも、それら細胞の発現や形態の変化を見た。

5) Snail の抑制系での検討: Snail 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。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 で測定した。つぎに、siRNAi の抑制実験を行う。種々の配列の siRNA を少量作成し、導入試薬にて培養細

胞へ導入し Snail 発現抑制効果を見た。

6) 生体での検討: 細胞の接着や遊走は生体レベルでは、創傷治癒や癌の進展形式に密接関連する。そこで、実験の進行が早ければ、Snail 強発現やロックダウン状態にした表皮細胞株で創傷治癒や癌の移植実験を行い、治療効果と基底膜分子の発現状況を観察する予定であった。

#### 4. 研究成果

1) 基底膜遺伝子のプロモーター解析: BPAG1 遺伝子と VII 型コラーゲン遺伝子プロモーターのいろいろな長さの調節領域をルシフェラーゼ遺伝子に結合したコンストラクトを用いた。ヒト正常表皮細胞を培養し、それらのコンストラクトを表皮細胞に導入した後、TGF- $\beta$ を添加してルシフェラーゼの活性を測定したところ、BPAG1 のコンストラクトを用いた系ではルシフェラーゼの活性の上昇が認められた。さらにVII型コラーゲンのコンストラクトでも同様の実験を行った。その結果、ルシフェラーゼの活性の上昇が認められた。この結果、TGF- $\beta$ は基底細胞で発現する基底膜蛋白の発現を抑えることが明らかとなり、EMT を抑制することが分かった。

2) 転写因子 Snail の結合部位の同定: ルシフェラーゼアッセイから推測された領域からコンピュータープログラムにて Sanil 結合部位の候補を推測した。BPAG1 プロモーター上の結合候補部位と同様の相補的なオリゴヌクレオチドを合成した、その部位へ結合する蛋白の存在を示唆する結果を得た。

3) シグナル伝達の解析: 今回の研究でどのシグナル伝達が働いているかを詳細に検討するのは難しいので阻害剤を用いた実験を行ったが、明らかな阻害を示すものは、今回の実験では同定できなかった。

4) Snail の強発現系での検討: Snail の cDNA を構築し、発現ベクターに挿入し発現ベクターを構築した。さらに、テトラサイクリンでの誘導可能なベクターも作成した。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の発現の変化を RT-PCR で測定したが、それらの遺伝子群

の発現の変化はなく、さらなる検討が必要であった。同時に、その逆の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も RT-PCR で確かめたが、これらの変化も認められなかった。以上から、発現ベクターの有用性の問題が示唆された。

5) 生体での検討: 今回の実験では生体系での検討を行う時間は少なく、Snail の抗体で免疫組織染色を行ったが、染色性が低く、解析ができなかった。

#### 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 13 件)

1. Takeuchi S, Nakano H, Rokunohe D, Nishizawa A, Kenoko T, Aizu T, Nakajima K, Matsuzaki Y, Sawamura D. Disseminated lupus vulgaris misdiagnosed as port-wine stain. *J Dermatol*, 37:916-918, 2010. 査読有
2. Takeda H, Ikenaga S, Kaneko T, Nakajima K, Harada K, Hanada K, Sawamura D. Proliferating trichilemmal tumor developing in nevus sebaceous. *Eur J Dermatol*, 20: 664-665, 2010. 査読有
3. Rokunohe D, Nakano H, Oshima H, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Sawamura D. Giant cutaneous granular cell tumour with papillomatous appearance. *Clin Exp Dermatol* 35:e7-9, 2010. 査読有
4. 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*, 20: 538-539, 2010. 査読有
5. Takiyoshi N, Nakano H, Kaneko T, Aizu T, Nakajima K, Akasaka E, Rokunohe D, Sawamura D. A linear basal cell carcinoma

- undergoing spontaneous regression.  
Clin Exp Dermatol 34: e411-413, 2009. 査読有
6. Takiyoshi N, Nakano H, Kaneko T, Aizu T, Nakajima K, Akasaka E, Rokunohe D, Sawamura D.  
Multiple desmoplastic trichoepitheliomas with ossification and cholesterol deposition.  
Clin Exp Dermatol 34: 634-635, 2009. 査読有
7. Nishikawa Y, Kaneko T, Kakiyoshi N, Aizu T, Nakajima K, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D.  
Dermoscopy of eccrine poroma with calcification.  
J Dermatol Case Rep 3: 52-54, 2009. 査読有
8. Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, Murai T, Tamai K, Sawamura D.  
Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa.  
J Dermatol 35: 336-340, 2008. 査読有
9. Nakajima K, Tamai K, Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D. Identification of Skn-1n, a splice variant that is induced by high calcium concentration and specifically expressed in normal human keratinocytes.  
J Invest Dermatol 128: 1336-1339, 2008. 査読有
10. Nakajima K, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe A, Ikenaga S, Aizu T, Kaneko T, Mitsuhashi Y, Sawamura D.  
Papillon-Lefevre syndrome and malignant melanoma: a high incidence of melanoma development in Japanese palmoplantar keratoderma patients.  
Dermatology 217: 58-62, 2008. 査読有
11. Minakawa S, Nakajima K, Aizu T, Nomura

- K, Kaimori M.  
A case of zosteriform metastatic skin cancer.  
Clin Exp Dermatol 33: 808-810, 2008. 査読有
12. Nishizawa A, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D, Satoh T, Yokozeki H.  
A de novo missense mutation in the keratin 13 gene in oral white sponge nevus.  
Br J Dermatol, 159: 974-975, 2008. 査読有
13. Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, Murai T, Tamai K, Sawamura D.  
Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa.  
J Dermatol 35: 336-340, 2008. 査読有

[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

中島 康爾 (MAKAJIMA KOJI)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：70374832

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：