

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：84503
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2013
 課題番号：23791304
 研究課題名（和文） 皮膚上皮が適切な形態を持つようになる仕組み～Bnip3の解析を通じて
 研究課題名（英文） Roles of Bnip3 in the differentiation and maintenance of epidermis.
 研究代表者
 森山 麻里子（MORIYAMA MARIKO）
 公益財団法人先端医療振興財団・研究員
 研究者番号：40595295

研究成果の概要（和文）：私たちはこれまでに、Hes1が表皮有棘層の維持に関与していることを明らかにしてきたが、今回、Hes1に制御される因子として、Bcl-2ファミリータンパク質の一つであるBNIP3を見出した。BNIP3の発現は顆粒層に認められ、BNIP3はオートファジーを介して表皮分化促進効果を持つことが明らかとなった。一方、BNIP3はUVB照射によるアポトーシスから細胞を保護し、皮膚表皮の形態維持に関与していることも明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Transcriptome analysis of *Hes1*^{-/-} mouse epidermis revealed the direct relationship between Hes1 and Bnip3, a potent inducer of autophagy. We found that BNIP3 was expressed in the suprabasal layer of the epidermis. We also found that BNIP3 plays a crucial role in keratinocytes differentiation by inducing autophagy. Furthermore, BNIP3 has a protective effect against UVB-induced apoptosis in keratinocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：ケラチノサイト 発生 分化

1. 研究開始当初の背景

皮膚表皮は外界からの細菌、ウイルス、その他異物が体内へ侵入することを防ぐ、大事な器官である。そのため、皮膚がバリア機能を獲得するにはどのように発生・分化をするのか、そのメカニズムの解明が重要な課題となっている。また、幹細胞生物学という観点から見ても、皮膚はケラチノサイトの幹細胞をはじめとした様々な幹細胞の宝庫であり、それらの幹細胞がいかに未分化性を保ち、またどのように分化していくのかを明らかにすることにより、再生医療への応用に展開していくことが期待されている。

申請者らは、発生中のマウス皮膚において、Notch シグナルが基底層上細胞から顆粒層へ

の分化を促進すると同時に、Hes1を介して顆粒層への分化を抑制することにより、有棘層の数を維持しているということを明らかにしてきた（Moriyama et al. Dev Cell 2008）。このことは、表皮が適切な形態を持つように発生するためには、未分化性の維持と分化のバランスを取る事が如何に重要であることを示した結果である。Hes1は転写抑制因子であることを考えると、Hes1が分化促進因子の発現を抑制しているのだろうと考え、正常マウスとHes1 KOマウス表皮間におけるマイクロアレイによる発現解析をおこなったところ、Bcl2ファミリー分子の一つであり細胞死誘導やオートファジー誘導分子であるBnip3がHes1 KOマウスで上昇し

ていることを見出した。また、免疫染色法で確認したところ、Bnip3 が胎児マウス表皮の基底層上細胞に発現している事を見出した。皮膚表皮の分化は脱核やミトコンドリア膜電位低下を伴い、特殊なアポトーシスであるとも考えられている。また、皮膚表皮には他の Bcl2 ファミリー分子である、Bcl2、BclxL、Bax など発現し、表皮分化にともなった発現制御がおこなわれている事が知られている。さらに、Bnip3 はオートファジーにも関与しているが、最近、表皮分化にともなって、オートファジーが起こっていることも示唆されていた。そこで、Bnip3 が表皮でどのような働きをしているのか、解明しようと試みた。

2. 研究の目的

Bnip3 の表皮の発生・分化における役割とともに、基底層上(suprabasal layer)に限局した Bnip3 の発現制御メカニズムを解明する事を目指す。これらの結果より、表皮がどのように適切な形態形成を獲得するかを明らかにする。具体的には以下のようなことを明らかにする。

①培養ケラチノサイトを用いて、Bnip3 が Hes1 によって制御されているのかどうかを確認する。また、Bnip3 遺伝子上流のプロモーターを解析し、Hes1 結合部位があるのか、もしあればクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、Hes1 が Bnip3 のプロモーターに直接結合するのかどうかを確かめる。

②マウスおよびヒト表皮における、Bnip3 の発現部位を明らかにする。

③Bnip3 がどのようなメカニズムで分化を促進しているのかを明らかにする。マウスおよびヒト培養ケラチノサイトを用いて Bnip3 を強制発現もしくはノックダウンし、Bnip3 が細胞死もしくはオートファジーを誘導して分化を誘導しているのかを確かめる。

④生体もしくは生体に近い3次元構築した皮膚においても、Bnip3 が表皮の適切な形態形成を獲得するのに必要なのかを確かめる。以上のことを解明することにより、皮膚最終分化における複雑なメカニズムの一端を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

1. 細胞培養

ヒト表皮由来初代角化細胞 (Human epidermal keratinocytes : HPEK) は CELLnTEC 社 (Bern, Switzerland) より購入した。培養には、CnT-57 培地 (CELLnTEC 社) を使用した。HPEK の分化には CnT-02 培地を使用し、カルシウム濃度を 1.2 mM に調整し、2 日に 1 度培地交換を行って分化誘導を行った。3 次元培養は、CnT-02-3DP1 (Epidermal Keratinocyte 3D Prime Medium, Human, Defined) 培地

(CELLnTEC 社) を用い、CELLnTEC 社のプロトコルに従った。

293T 細胞は ATCC 社 (Manassas, VA, USA)、293A 細胞は Invitrogen 社 (Carlsbad, CA, USA) より購入した。培養は、DMEM (ナカライテスク, 京都, 日本) に 10% ウシ胎児血清 (GIBCO, Carlsbad, CA, USA)、1×抗生物質・抗真菌剤混合溶液 (ナカライテスク)、10 mM HEPES (ナカライテスク) を添加した培地を用いた。

2. ウェスタンブロッティング法

細胞を Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 1% SDS, 1mM DTT) にプロテアーゼ阻害剤 (ナカライテスク) を添加したものでタンパク質の抽出を行った。SDS を含むポリアクリルアミドゲルで泳動、分離を行った。分離したタンパク質は PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。今回実験で使用した抗体は、一次抗体として、抗 BNIP3 マウスモノクローナル抗体 (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA; 1000 倍希釈)、抗 Cleaved Caspase3 ウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; 1000 倍希釈)、抗 Actin マウスモノクローナル抗体 (Clone C4) (Millipore; 10000 倍希釈) を用いた。二次抗体では、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (いずれも Cell Signaling Technology; 5000 倍希釈) を用いた。検出はイモビロン HRP 化学発光検出試薬 (Millipore) を使用し、37 °C で 5 分間インキュベーションした後、GE ヘルスケア社 (Chalfont St. Giles, UK) の ImageQuant LAS 4000 を用いて撮影した。

3. 凍結切片作製

3 次元培養皮膚、マウス胎児皮膚組織は 4% PFA に浸し、600W、30 秒間マイクロウェーブ処理し、氷上で 30 分間固定処理を行った。PBS で 3 回洗浄した後、10% Sucrose/PBS に 4°C 30 分～1 時間、20% Sucrose/PBS に 4°C オーバーナイトで浸潤処理を行った。翌日、組織片を Tissue-Tek Cryomold (サクラファインテックジャパン社、江東区、東京、日本) に入れ、O. C. T Compound (サクラファインテックジャパン社) で包埋した。その後、CM3050s (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) で凍結切片を作製した。

4. レンチウイルスベクターの作製

レンチウイルスベクターを作成するため、レンチウイルス作製用プラスミドをパッケージングプラスミドとともに、293T 細胞にトランスフェクションした。2 日後、レンチウイルスベクターを含む上清を回収し、6000G で 16 時間、4°C にて濃縮した。

5. アデノウイルスベクターの作製

アデノウイルスベクターを作製するために、ViraPower Adenovirus expression system (Invitrogen 社) を用い、Invitrogen

社のプロトコルに従った。

6. 免疫染色法

HPEK は 4% PFA を用いて 10 分間浸し、細胞を固定させた後、2% PBMST (2% スキムミルク, 0.1% Triton X 含有 PBS) でブロッキングを行った。1 次抗体として、ウサギポリクローナル抗体である抗 Loricrin 抗体 (COVANCE, Princeton, NJ, USA) (1/1000 倍希釈)、抗 GFP 抗体 (Invitrogen) (1/1000 倍希釈) を用いた。2 次抗体として、ロバポリクローナル抗体である Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) (1/1000 倍希釈)、Alexa 546 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) (1/1000 倍希釈) を用いた。PBST (PBS, 0.1% Triton X 含有 PBS) で洗浄し、DAPI (1 μ g/ml, Roche, City, State, Switzerland) (1/5000 倍希釈) を添加した。3 次元構築モデルは凍結切片作成後、PBS で洗浄した後 PBMST でブロッキングを行った。1 次抗体として、ウサギポリクローナル抗体である抗 Loricrin 抗体 (COVANCE) (1/1000 倍希釈)、抗 GFP 抗体 (Invitrogen) (1/1000 倍希釈)、ヤギポリクローナル抗体である抗 BNIP3 (SANTA CRUZ biotechnology, Delaware Avenue, California, USA) (1/100 倍希釈) を用いた。2 次抗体として、ロバポリクローナル抗体である Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa 488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Invitrogen) を用いた。PBST で洗浄し、Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) を用いて封入を行った。

7. クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降は SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit (Cell Signaling Technologies 社) を用い、Cell Signaling Technologies 社のプロトコルに従って行った。

8. 定量的 PCR

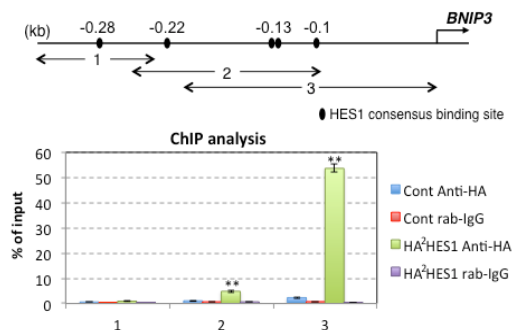
QIAshredder および RNeasy Micro Kit (Qiagen) を使用し、Qiagen 社のプロトコルに従ってトータル RNA を抽出した。cDNA は、トータル RNA 1 μ g から、Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) を使用して合成した。合成した cDNA は、MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) を使用して精製した。定量的 PCR は SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad) を使用して行った。

4. 研究成果

① Hes1 は Bnip3 の発現を直接抑制する

我々は以前、発生中の胎児マウス表皮基底層上細胞に Hes1 が発現していることや、その Hes1 が表皮有棘層の未分化性維持に必須であることを明らかにした。そこで本研究では、Hes1 がどのように有棘層の早熟分化を抑制しているのか、その分子機構を明らかにしようと考えた。そのために、表皮における

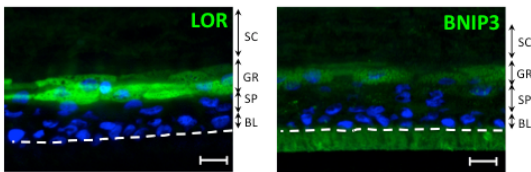
Hes1 の下流遺伝子を探索しようと試み、胎生 14.5 日目の野生型マウスおよび Hes1 KO マウス胎児の表皮から mRNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。その結果、Hes1 KO マウスの表皮において、Bcl2 ファミリー遺伝子の一つである Bnip3 の発現上昇が確認された。そこで、Hes1 KO マウスにおいて実際に Bnip3 遺伝子の発現が上昇しているか検討するために、q-PCR を行った。その結果、Hes1 KO マウス表皮において、Bnip3 遺伝子が約 2.5 倍上昇していることを見出した。これらの結果は、Hes1 が Bnip3 遺伝子の発現を抑制することを示唆する。そこで、この仮説を検証するため、ヒト表皮由来初代角化細胞 (HPEK) にアデノウイルスベクターを用いて、Bnip3, NICD, Hes1 を過剰発現させ、ウェスタンブロッティング法により BNIP3 タンパク質の発現量を確認した。その結果、Hes1 を過剰発現させた HPEK では BNIP3 のタンパク質発現量が減少していることが分かった。以上の結果より、Hes1 が Bnip3 の発現を抑制していることが示された。Hes1 は転写抑制因子であることから、Hes1 による Bnip3 遺伝子発現の抑制は、直接的である可能性が考えられた。その可能性を検証するために、表皮細胞にて BNIP3 のプロモーターに直接 Hes1 が結合しているのか検討した。まず、BNIP3 遺伝子上流 2 kb のプロモーター領域内において、Hes1 の結合領域を MatInspector ソフトウェア (Genomatix 社) により予想したところ、図 1 に示した 5 つの領域が候補となった。そこで、ヒト表皮角化細胞において、Hes1 が実際にこれら 5 つの領域に結合するかどうかを確かめるため、HPEK に HA タグのついた Hes1 を過剰発現させ、抗 HA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。その結果、Hes1 はプロモーター領域の -212 bp から +22 bp を含む領域に結合していることが明らかになった (図 1)。このことから、Hes1 が直接 BNIP3 のプロモーター領域に結合することによって、BNIP3 の発現を負に制御していることが示された。



(図 1) BNIP3 プロモーターにおける Hes1 の直接結合

②BNIP3 は表皮において顆粒層に発現している

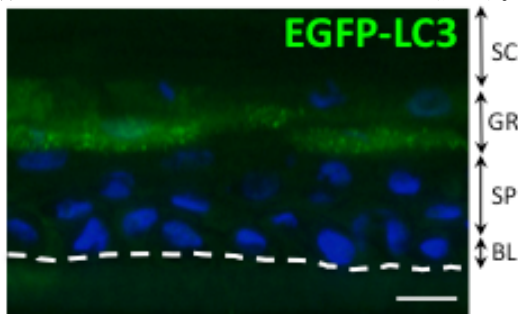
これまでの結果を踏まえると、*Hes1* KO マウスの表皮では *Bnip3* の発現が上昇することによって、有棘層の早熟分化を促している可能性が考えられた。そこで、正常表皮における BNIP3 の局在を調べることで、BNIP3 が表皮分化に影響を与える可能性があるのか検討を行った。HPEK より 3 次元皮膚構築モデルを作製し、顆粒層の指標であるロリクリンおよび BNIP3 に対する免疫染色に供した。その結果、皮膚 3 次元構築モデルにおいて BNIP3 が顆粒層に局在していることが明らかになった(図 2)。



(図 2) ヒト表皮 3 次元構築モデルにおけるロリクリンと BNIP3 の発現

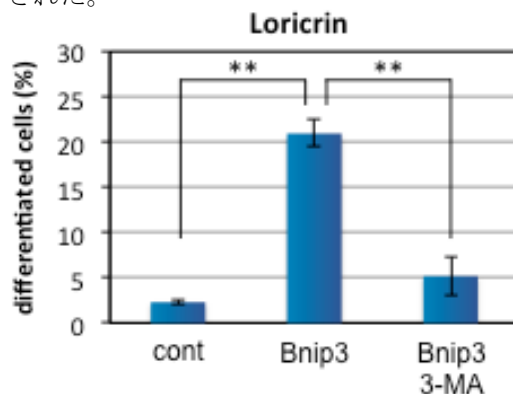
③BNIP3 はオートファジーを引き起こし、顆粒層への分化を促進させる

BNIP3 は細胞内においてミトコンドリアに局在し、オートファジーに関与することが報告されている。また、最近、表皮分化にオートファジーが関与していることが示唆されている。そこで、我々は、顆粒層に発現する BNIP3 がオートファジーを引き起こすことにより、表皮分化を促進しているのではないかという仮説を立てた。まず、表皮においてオートファジーが起こっているのか明らかにするために、皮膚 3 次元構築モデルを用いてオートファゴソームの形成を観察しようと試みた。オートファゴソームの形成は、オートファゴソームに特異的に集積するタンパク質である LC3 に EGFP を融合させた、EGFP-LC3 を観察することにより検出した。まず、HPEK に EGFP-LC3 を導入し、3 次元構築した皮膚モデル内での EGFP-LC3 の局在を、GFP に対する免疫染色法により確認した。その結果、顆粒層にてオートファゴソームが形成されていることが明らかになった(図 3)。



(図 3) ヒト表皮 3 次元構築モデルにおけるオートファゴソームの形成

この結果より、表皮の最終分化にオートファジーが関与していることが示唆された。次に、BNIP3 が顆粒層への分化に関与しているのかを明らかにするために、HPEK に *Bnip3* の過剰発現、または、発現抑制を行い、分化誘導をおこなった。その結果、*Bnip3* を過剰発現させると分化マーカーであるロリクリンの発現が上昇し、BNIP3 を発現抑制するとロリクリンの発現量が減少した。この結果は、BNIP3 が顆粒細胞への分化に促進的に機能することを示している。次に、BNIP3 がオートファジーを亢進させるのか確かめるために、EGFP-LC3 を導入した HPEK に BNIP3 を過剰発現させ、EGFP-LC3 の局在を免疫染色法で確認したところ、コントロールの HPEK と比べ、オートファゴソームを形成している細胞が有意に多いことを確認した。一方、オートファジーの阻害剤である 3-メチルアデニンを追加すると、ドット状に観察される EGFP-LC3 が減少したことから、このドットがオートファゴソームの形成を表していることが示された。逆に、BNIP3 の発現抑制を行った HPEK では、コントロールの HPEK と比べ、オートファジーを起こしている細胞が有意に減少した。さらに、表皮分化において BNIP3 がオートファジーを介して分化を促進させるのか検討するために、BNIP3 を過剰発現させた HPEK に 3-メチルアデニン (5 mM) を添加し、免疫染色法によりロリクリンの発現量を確認した。その結果、3-メチルアデニンを添加した細胞で、分化した細胞の割合が減少していることを確認した(図 4)。以上の結果から、*Bnip3* がオートファジーを介して皮膚角化細胞の分化を促進させていることが示唆された。



(図 4) *Bnip3* とオートファジーがケラチンサイト分化に与える影響

④BNIP3 が表皮の形態維持に関与している

次に我々は、BNIP3 の発現をノックダウンすることにより、表皮の形態形成に変化がみら

れるのか、3次元での検討を行った。BNIP3をノックダウンしたHPEKより3次元皮膚構築モデルを作成し、ヘマトキシリン/エオジン染色を行ったところ、表皮の形態形成における、明白な表現型はみられなかった (Fig. 8)。しかし、面白い事に、BNIP3ノックダウン皮膚モデルでは、アポトーシス様の細胞であるサンバーン細胞が多くみられることに気がついた。各切片においてサンバーン細胞を数えたところ、BNIP3ノックダウン皮膚モデルでは、コントロールの皮膚モデルに比べて、約3-6倍のサンバーン細胞が確認できた。この結果から、BNIP3は表皮において、形態維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、UVBをHPEKに照射し、BNIP3タンパク質の発現量と、アポトーシスの指標であるCaspase3の活性化を、ウェスタンブロッティング法にて確認した。その結果、UVB照射により、BNIP3のタンパク質が上昇し、Caspase3の活性化も見られたことより、UVB照射によって、BNIP3の発現上昇とアポトーシス誘起が起ることが示された。興味深いことに、BNIP3を抑制したHPEKでは、コントロールの細胞と比べて、UVB照射時におけるcleaved Caspase3のタンパク質量がさらに上昇し、BNIP3を抑制すると、UVB照射によるアポトーシスが誘起されることが示された。このことから、UVB照射されたHPEKではBNIP3の発現が上昇し、そのBNIP3がUVB照射によるアポトーシスからHPEKを保護していることが示唆された。

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 2件)

(1) Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system.

Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. ***PLoS ONE***. 8(6): e66274. (2013)

(2) Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. ***BMC Cell Biol.*** 13(1): 21. (2012)

[学会発表] (計 6件)

(1) Mariko Moriyama, Junki Uda, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an

inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. 11th Annual Meeting, ISSCR. Boston, USA.

(2) Mariko Moriyama, Junki Uda, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. 第一回皮膚の会. 岐阜, 高山, 日本.

(3) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Fukuoka, Japan.

(4) Mariko Moriyama, Junki Uda, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. 【Oral presentation】The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, Japan

(5) 宇田純輝, 森山麻里子, 北川綾弓, 野村昇吾, 松山晃文, 森山博由, 早川堯夫. Bc12ファミリー分子 BNIP3が表皮構築に及ぼす影響. 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会

(6) 宇田純輝, 森山麻里子, 北川綾弓, 野村昇吾, 松山晃文, 森山博由, 早川堯夫. Bc12ファミリー分子 BNIP3が表皮構築に及ぼす影響. 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/biomedical/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 麻里子 (MORIYAMA MARIKO)

公益財団法人先端医療振興財団・研究員

研究者番号: 40595295