

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591643

研究課題名(和文)表皮角化細胞における終末分化の分子機構の解明と皮膚癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism in keratinocyte terminal differentiation

## 研究代表者

牧野 輝彦(Makino, Teruhiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：90359711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Profilaggrinはこの角化において中心的な役割を担う分子であり、profilaggrinが切断される際、EF hand domainを含むN末領域(proFLG-N)は核内に移行することが知られている。このFLG-Nが核内に移行しDNAを分解し細胞死を誘導すること、その機能にproFLG-NのA domainが関与していることを見出した。同時に、mesotrypsinにより profilaggrinからFLG-Nが切断されること、さらにDNAの分解にはcaspase14によりICADから遊離したCaspase-activated DNase(CAD)も関与していることを明らかにした

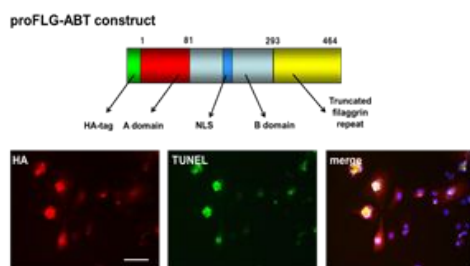
研究成果の概要(英文)：Profilaggrin plays a critical role in keratinocyte terminal differentiation. During this process, a 55-kDa N-terminal fragment of profilaggrin (proFLG-N) is translocated into the nucleus. In this study, we examined a function of FLG-N in keratinocytes and elucidated the molecular mechanisms of the terminal differentiation. Interestingly, proFLG-N was liberated by epidermal mesotrypsin and was translocated into the nucleus; thereafter, the cells became TUNEL positive. This finding was also observed when A-domain of proFLG-N, but not proB-domain, was translocated into the nucleus. Furthermore, caspase-14 caused limited proteolysis of ICAD, followed by accumulation of CAD in TUNEL-positive nuclei. Knockdown of both proteases resulted in a significant increase of remnant nuclei in a skin equivalent model. Collectively, our results indicate that at least two pathways are involved in the DNA degradation process during keratinocyte terminal differentiation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：プロフィラグリン 皮膚 表皮角化細胞 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚の終末分化である「角化」は生物学的に細胞死のひとつであり、皮膚組織構築のなかで重要な位置を占める。この過程には loricrin や Profilaggrin、Transglutaminase 1 など多くの分子が協調的に関与していることが知られている。しかし、これらの角化関連分子の制御機構、特に最終段階である細胞死の誘導に関しては未だ不明のままである。Profilaggrin は角化において中心的な役割を担う分子である。N 末端に  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain である EF hand domain を有しそれに多くの反復配列が続く、いわゆる fused-type の S100 タンパク質であり、角化の過程で切断された反復配列の 1 単位である filaggrin がケラチンを重合する。またその切断の際、EF hand domain を含む N 末領域(proFLG-N)が核内に移行することが報告されている。核内に移行した N 末領域の機能は明らかではないが、角化の過程において重要な役割を有している可能性が示唆される。我々はこれまで proFLG-N に注目し、この領域が表皮角化細胞に及ぼす影響について検討してきた。proFLG-N を表皮角化細胞など哺乳類細胞で発現するコンストラクトを各種作製した。N 末端領域をすべて含む(1-292aa)コンストラクト(proFLG-ABT)を表皮角化細胞に導入したところ、誘導タンパクは核に局在し、導入された細胞は TUNEL 染色で陽性となり細胞死に至った。さらに N 末端における機能部位を同定するため N 末端内の A domain (1-82aa) と B domain(83-292aa)を発現するコンストラクトを作製した。A domain は各局在シグナルを持たないため、コンストラクトの C 末端に付加した(proFLG-Anls)。これらを表皮角化細胞に導入したところ、両者の誘導タンパクはともに核に局在したが、A domain を導入された細胞でのみ TUNEL 染色で陽性となった。以上より profilaggrin の N 末領域は細胞死を誘導することが確認され、その A domain 内に機能部位が存在することが示唆された。



一方、平均寿命の延長に伴い皮膚癌の罹患率も増加しており、基底細胞癌や有棘細胞癌がその多くを占めている。両腫瘍ともに早期発見され完全に切除されれば治癒に至るが、時に進行例も存在する。特に進行し他臓器へ転移した有棘細胞癌に対しては放射線療法や化学療法などが行われるが、その奏功率は決して十分ではない。そのため近年皮膚癌に対する免疫療法や遺伝子治療の開発が試み

られている。その中である種の機能性蛋白質の一部を用いて細胞にアポトーシスを誘導させるペプチド療法も有力な治療法の一つである。

## 2. 研究の目的

### (1) proFLG-N の核内移行による終末分化の分子機構の解明

本研究では proFLG-N が核内に移行した後、どのような機序で細胞死に至るのかを解明する。具体的にはまず核内で proFLG-N と結合しうる蛋白質を同定し、細胞死にいたるシグナル伝達経路を検索する。さらに Caspase14 など表皮角化細胞の細胞死と関連が示唆されている分子との相互作用についても検討する。

### (2) 皮膚有棘細胞癌に対する新規ペプチド療法の開発

これまでの研究から Profilaggrin の A domain が細胞死に関与していることが示唆されている。さらに詳細にその機能を担う重要な部位を同定するため N 末領域を約 20 アミノ酸に区切り合成ペプチドを作製し、正常表皮角化細胞に導入しその作用を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) proFLG-N の核内移行による終末分化の分子機構の解明

proFLG-N に結合する蛋白質の検索  
増殖期にある培養表皮角化細胞と高  $\text{Ca}^{2+}$  環境下で培養し分化を誘導した培養表皮角化細胞の細胞質と核よりそれぞれ蛋白質を抽出する。proFLG-N の GST-融合リコンビナント蛋白質と培養表皮角化細胞から抽出した各蛋白質を混合し、その後グルタチオンセファロースで共沈降する。この共沈降で得られた蛋白質を LC/MS/MS を用いてプロテオミクス解析し、分化した表皮角化細胞の核蛋白質画分でのみ検出された蛋白質を proFLG-N と結合しうる候補蛋白質とする。

proFLG-N と結合する蛋白質の解析

1) RNAi により候補蛋白質の発現が抑制されている状況で、proFLG-ABT や proFLG-Anls を細胞に導入し、細胞死に関与するかを検討する。

2) HA tag を付加した proFLG-N と N 末端に HA tag、C 末端に Myc tag を付加した候補蛋白質を用いて免疫沈降を行いそれぞれの蛋白質が結合しているかを確認する。

proFLG-N と他分子の相互作用の検討

Caspase14 や mesotrypsin など表皮角化細胞の角化や細胞死と関連が示唆されている分子との相互作用についても検討する。

### (2) 皮膚有棘細胞癌に対する新規ペプチド療法の開発

proFLG-N の機能ペプチドの同定

これまでの研究の結果から proFLG-N の A domain に細胞死に関与する部位が存在することが示唆されている。A domain は 82 アミノ酸からなるため約 20 アミノ酸に区切り合成ペプチドを作製する。ペプチドを核内に誘導するため N 末に HIV の TAT 配列を結合させたペプチドを合成し、これらを培養表皮角化細胞や HaCaT 細胞に導入し細胞増殖や細胞死に及ぼす影響を調べる。

TAT-<sup>1-18</sup>proFLG-N: YGRKKRRQRRRMSTLLENIFAIINLFKQYS  
 TAT-<sup>20-38</sup>proFLG-N: YGRKKRRQRRRKDKNTDTLSKKEKELLEK  
 (下線はTAT配列)

#### 4. 研究成果

##### (1) proFLG-N の核内移行による終末分化の分子機構の解明

proFLG-N に結合する蛋白質の検索  
 表皮角化細胞から抽出した蛋白質と proFLG-N と結合する蛋白質を LC/MS/MS 解析で検索したところ、proFLG-N と結合する可能性を持つ蛋白質が 135 個得られた。このうち分化した表皮角化細胞の核のみで proFLG-N と結合する可能性を持つ蛋白質は 37 個得られ、これらを proFLG-N 誘導細胞死に関与しうる候補蛋白質とした。

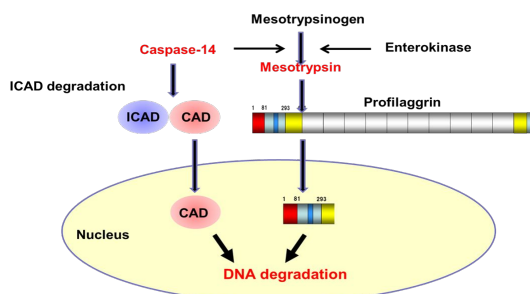
proFLG-N と結合する蛋白質の解析

1) シグナルに関与する可能性を持つ候補蛋白質の RNAi を作製し、その発現が抑制されている状態で、proFLG-ABT や proFLG-Anls を細胞に導入したところ、pinin RNAi を導入した細胞で細胞死が抑制された。

2) proFLG-N と pinin の相互関係を検討するため、それぞれを発現するコンストラクトを作製し免疫沈降法を行ったところ両者が複合体を形成していることが確認された。

proFLG-N と他分子の相互作用の検討

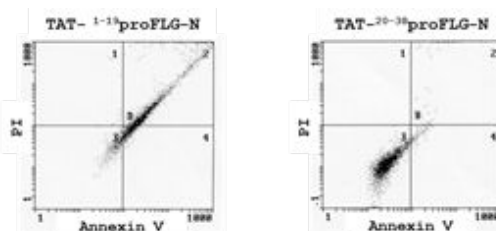
Caspase14 や mesotrypsin などとの相互作用についても検討したところ、mesotrypsin により profilaggrin から proFLG-N が切断されること、さらに表皮角化細胞の DNA の分解には caspase14 により inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD)から遊離した Caspase-activated DNase (CAD) が proFLG-N と独立した経路で関与していることが明らかになった。



##### (2) 皮膚有棘細胞癌に対する新規ペプチド療法の開発

proFLG-N の機能ペプチドの同定

proFLG-N の A domain を 19-20 アミノ酸からなるペプチドに分解し N 末に HIV の TAT 配列を結合させたペプチドを合成し、これらを培養表皮角化細胞や HaCaT 細胞に導入したところ、最も N 末端に存在するペプチド(1-19 アミノ酸; 1-19proFLG-N) で細胞死が誘導された。これらのペプチドで処理した細胞を annexin V/PI 用いて FACS 解析を行ったところ処理後 30 分でほとんどの細胞が後期アポ



トーシス/ネクローシスの分画に存在していた。現在皮膚有棘細胞癌などの培養細胞においても同様の作用を有するか検討している。

#### 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 22 件)

1. A novel deletion mutation of the ATP2C1 gene in a family with Hailey-Hailey disease.

Makino T, Shimizu K, Mizawa M, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T.

Eur J Dermatol. *in press*

2. Decreased filaggrin-2 expression in the epidermis in a case of pityriasis rotunda.

Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T.

Clin Exp Dermatol. *in press*

3. Extramammary Paget's disease occurring in the context of Cowden syndrome: true association or mere coincidence?

Matsui K, Makino T, Mizawa M, Hamashima T, Hanakawa H, Hatta N, Sasahara M, Shimizu T.

Eur J Dermatol. 2015; 25: 89-91.

4. Late presentation of X-linked dyskeratosis congenita with a missense mutation in codon 350 of the dyskerin protein.

Mori N, Makino T, Mizawa M, Kagoyama K, Kanegane H, Sakaguchi H, Miyazono T, Kojima S, Shimizu T.

Eur J Dermatol. 2015; 25: 75-6.

5. Creeping eruption due to Spirurina type X larva.

Makino T, Mori N, Sugiyama H, Mizawa M, Seki Y, Kagoyama K, Shimizu T.

Lancet. 2014; 384: 2082.

6. Immunohistological examination of a skin lesion in a Japanese case with hand, foot and mouth disease caused by coxsackie-virus A6. Seki Y, Makino T, Mizawa M, Hamashima T, Sasahara M, Shimizu T. *Eur J Dermatol*. 2014; 24: 506-7.
7. Expression of filaggrin-2 protein in the epidermis of human skin diseases: a comparative analysis with filaggrin. Makino T, Mizawa M, Yamakoshi T, Takaishi M, Shimizu T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 449: 100-6.
8. Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. Yamamoto-Tanaka M, Makino T, Motoyama A, Miyai M, Tsuboi R, Hibino T. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1181.
9. Induction of skin lesions by ultraviolet B irradiation in a case of pemphigus erythematosus. Makino T, Seki Y, Hara H, Mizawa M, Matsui K, Shimizu K, Shimizu T. *Acta Derm Venereol*. 2014; 94: 487-8.
10. Detection of hypohidrosis in Japanese patients with pigmentary mosaicism. Shimizu K, Makino T, Ueda C, Takegami Y, Matsui K, Mizawa M, Shimizu T. *Eur J Dermatol*. 2013; 23: 913-4.
11. Stress evaluation in adult patients with atopic dermatitis using salivary cortisol. Mizawa M, Yamaguchi M, Ueda C, Makino T, Shimizu T. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 138027.
12. Erythema papulatum centrifugum: a sweat-related dermatitis. Ueda C, Makino T, Mizawa M, Shimizu T. *J Am Acad Dermatol*. 2013; 69: e103-5.
13. Ultraviolet B irradiation induces the expression of hornerin in xenotransplanted human skin. Makino T, Yamakoshi T, Mizawa M, Shimizu T. *Acta Histochem*. 2014; 116: 20-4.
14. Clinical and histopathological features of itch in patients with alopecia areata. Yamakoshi T, Andoh T, Makino T, Kuraishi Y, Shimizu T. *Acta Derm Venereol*. 2013; 93: 575-6.
15. Trichohyalin-like 1 protein, a member of fused S100 proteins, is expressed in normal and pathologic human skin. Yamakoshi T, Makino T, Rehman MU, Yoshihisa Y, Sugimori M, Shimizu T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 432: 66-72.
16. Effectiveness of keishibukuryogan on chronic-stage lichenification associated with atopic dermatitis. Mizawa M, Makino T, Hikiami H, Shimada Y, Shimizu T. *ISRN Dermatol*. 2012; 2012: 158598.
17. Repigmentation of the epidermis around the acrosyringium in piebald skin: an ultrastructural examination. Makino T, Yanagihara M, Oiso N, Mizawa M, Shimizu T. *Br J Dermatol*. 2013; 168: 910-2.
18. Maintenance of remission with low-dose olopatadine hydrochloride for itch in well-controlled chronic urticaria. Makino T, Takegami Y, Rehman MU, Yoshihisa Y, Ishida W, Toyomoto T, Shimizu T. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2012; 5: 141-6.
19. Efficacy of chlorhexidine gluconate ointment (Oronine H(@)) for experimentally-induced comedones. Yamakoshi T, Makino T, Matsunaga K, Yoshihisa Y, Rehman MU, Seki T, Hayashi Y, Shimizu T. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2012; 5: 79-83.
20. Blaschkoid distribution of cylindromas in a germline CYLD mutation carrier. Furuichi M, Makino T, Yamakoshi T, Matsui K, Shimizu T. *Br J Dermatol*. 2012; 166: 1376-8.
21. Noninvasive biosensor for cathepsin L in the stratum corneum. Yamaguchi M, Date A, Sasaki M, Makino T, Shimizu T. *Skin Res Technol*. 2012; 18: 332-8.
22. Novel mutation of the KRT 10 gene in a Japanese patient with epidermolytic hyperkeratosis. Makino T, Furuichi M, Asano Y, Shimizu T. *J Dermatol*. 2012; 39: 87-9.
- 〔学会発表〕(計4件)
1. 牧野輝彦 .  
試験に出る遺伝性疾患 .  
第 65 回日本皮膚科学会中部支部学術大会(教育講演) ; 2014 Oct 25-26 ; 大阪 .
2. 牧野輝彦 .  
表皮角化細胞における終末分化の分子機構の解明 .

第 112 回日本皮膚科学会総会 ; 2013 Jun  
14-16 ; 横浜 .

3. Makino T, Yamamoto M, Yamakoshi T,  
Rahaman UM, Hibino T, Shimizu T.

An analysis of profilaggrin N-terminal fragment  
function in keratinocyte terminal differentiation.

The 72nd Annual Meeting of the Society for  
Investigative Dermatology, 2012, 5, 9-12,  
Raleigh, North Carolina USA.

4. Murayama S, Furuichi M, Takegami Y,  
Makino T, Shimizu T.

Two cases of keratosis follicularis squamosa  
(Dohi) caused by swimsuit friction.

Second Eastern Asia Dermatology Congress,  
2012, 6, 13-15, Beijing, China.

〔図書〕(計 1 件)

1. Makino T. Current Genetics in Dermatology.  
InTech Publisher. Rijeka; edited by Naoki Oiso;  
2013. Chapter 13, Multiple Cutaneous and  
Uterine Leiomyomatosis; p.143-54.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

牧野輝彦 (MAKINO Teruhiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
准教授

研究者番号 : 9 0 3 5 9 7 1 1

### (2)研究分担者

清水忠道 (SHIMIZU Tadamichi)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授

研究者番号 : 7 0 2 6 0 3 9 6

### (3)連携研究者

日比野利彦 (HIBINO Toshihiko)

資生堂リサーチセンター・

セニアサイエンティスト